

**Alma Mater Studiorum – Università di Bologna**

**DOTTORATO DI RICERCA IN**

**SCIENZE BIOMEDICHE**

**Ciclo XVII**

**Settore Concorsuale di afferenza: 05/H1**

**Settore Scientifico disciplinare: BIO/16**

**STUDIO DELLE CITOCHINE NELLA DISTROFIA MUSCOLARE DI  
EMERY-DREIFUSS: POSSIBILI MARKER PATOGENETICI E  
BERSAGLI DI CURA DELLA MALATTIA**

**Presentata da:**

**Dott. Sabino Prencipe**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Prof. Lucio Cocco**

**Prof. Lucio Cocco**

**Esame finale anno 2014**

## Abstract

Emery-Dreifuss muscular dystrophy is a degenerative myopathy characterized by weakness and atrophy of muscle without involvement of the nervous system. Moreover, EDMD patients present cardiomyopathy with conduction defects causing risk of sudden death. Different studies highlighted cytokine involvement in muscular dystrophy, causing chronic inflammation, bone resorption or cellular necrosis. We carried out a simultaneous assessment of the concentration of 24 secreted molecules using a wide screening approach. We tested serum concentrations of cytokines, chemokines and growth factors in 25 EDMD patients. Analysis showed an increase of IL-17, TGF $\beta$ 2, INF $\gamma$ , and TGF $\beta$ 1. Furthermore, decrease of VEGF and of the chemokine Rantes was observed in EDMD patients. Further analysis displayed an increase of TGF $\beta$ 2 and IL-6 levels in culture medium of EDMD skin fibroblasts. To test the effect of altered cytokine levels in muscle, we used conditioned medium from EDMD fibroblasts to culture differentiating mouse myoblasts. Reduced rate of myoblast differentiation was observed in the presence of EDMD conditioning media. Moreover, neutralizing antibodies against TGF $\beta$ 2 and IL-6 rescued myogenic differentiation. In C2C12 mouse myoblasts expressing the H222P *Lmna* mutation, we did not observe altered cytokine levels or beneficial effects of neutralizing antibodies. These results show a pathogenetic effect of the altered secretory phenotype here observed in fibroblasts and serum from EDMD patients, hinting at a major role of fibrotic tissue in muscle malfunctioning in EDMD. Furthermore, we observed an intrinsic effect of lamin A mutations on the expression of caveolin 3 in differentiating EDMD myoblasts. Our data add to the existing knowledge on the complex EDMD pathogenesis and confirm that cell intrinsic and extrinsic factors contribute to disease. Neutralization of extrinsic factors by specific antibodies, as shown in this study, may represent a possible therapeutic perspective.

## Sommario

La distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD) è una miopatia degenerativa ereditaria caratterizzata da debolezza e atrofia dei muscoli senza coinvolgimento del sistema nervoso. Individui EDMD presentano, inoltre, cardiomiopatia con difetto di conduzione che provoca rischio di morte improvvisa. Diversi studi evidenziano un coinvolgimento di citochine in diverse distrofie muscolari, causanti infiammazione cronica, riassorbimento osseo, necrosi cellulare. Abbiamo effettuato una valutazione simultanea della concentrazione di citochine, chemochine, fattori di crescita, presenti nel siero di un gruppo di 25 pazienti EDMD. L'analisi effettuata ha evidenziato un aumento di citochine quali IL-17, TGFβ2, INF-γ e del TGFβ1. Inoltre, una riduzione del fattore di crescita VEGF e della chemochina RANTES è stata rilevata nel siero dei pazienti EDMD rispetto ai pazienti controllo. Ulteriori analisi effettuate tramite saggio ELISA hanno evidenziato un aumento dei livelli di TGFβ2 e IL-6 nel terreno di coltura di fibroblasti EDMD2. Per testare l'effetto nei muscoli, di citochine alterate, abbiamo utilizzato terreno condizionante di fibroblasti EDMD per differenziare mioblasti murini C2C12. Una riduzione del grado di differenziamento è stata osservata nei mioblasti condizionati con terreno EDMD. Trattando queste cellule con anticorpi neutralizzanti contro TGFβ2 e IL-6 si è avuto un miglioramento del grado di differenziamento. In C2C12 che esprimevano la mutazione H222P del gene *Lmna*, non sono state osservate alterazioni di citochine e benefici di anticorpi neutralizzanti. I dati mostrano un effetto patogenetico delle citochine alterate come osservato in fibroblasti e siero di pazienti, suggerendo un effetto sul tessuto fibrotico di muscoli EDMD. Un effetto intrinseco alla mutazione della lamina A è stato rilevato sull'espressione di caveolina 3 in mioblasti differenziati EDMD. I risultati si aggiungono a dati forniti sulla patogenesi dell' EDMD confermando che fattori intrinseci ed estrinseci contribuiscono alla malattia. Utilizzo di anticorpi neutralizzanti specifici contro fattori estrinseci potrebbe rappresentare un approccio terapeutico come mostrato in questo studio.

# Indice

## 1. Introduzione

1.1 La distrofia muscolare di Emery-Dreifuss .....	5
1.2 Quadro clinico delle diverse forme di distrofia muscolare di Emery-Dreifuss .....	6
1.3 Ipotesi patogenetiche nella distrofia muscolare di Emery-Dreifuss .....	7
1.3.1 EDMD legata a mutazioni del gene EMD (EDMD 1).....	7
1.3.2 EDMD legata a mutazioni del gene LMNA (EDMD 2 e 3) .....	8
1.4 Il ruolo delle citochine nelle distrofie muscolari .....	10
1.5 Proprietà delle citochine .....	11
1.5.1 Interleuchina 6 (IL-6) .....	12
1.5.2 Interferone $\gamma$ (IFN $\gamma$ ).....	13
1.5.3 TGF $\beta$ .....	14
1.5.4 Fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ) .....	18
1.6 Studio delle citochine tramite Bio-Plex Multiplex System .....	19

## 2. Materiali e metodi

2.1 Raccolta siero di pazienti EDMD .....	22
2.2 Processamento del siero da prelievo ematico.....	22
2.3 Misurazione delle citochine tramite Bio-Plex Multiplex System....	22
2.4 Colture cellulari.....	24
2.5 Analisi di microscopia a fluorescenza .....	25
2.6 Analisi statistica.....	25

## 3. Risultati

3.1 Studio delle citochine in pazienti con EDMD .....	27
3.2 Citochine in sieri e in fibroblasti di pazienti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss .....	28
3.3 Studio dell'effetto delle citochine nel differenziamento miogenico .....	35

## 4 Discussione e conclusioni..... 42

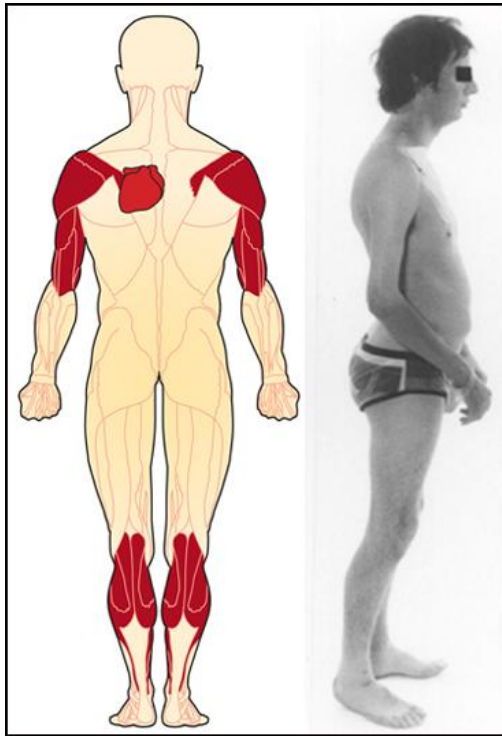
## 5 Bibliografia..... 45

## 1. Introduzione

### 1.1 La distrofia muscolare di Emery-Dreifuss

La distrofia muscolare di Emery-Dreifuss (EDMD) è una miopatia degenerativa ereditaria caratterizzata da debolezza e atrofia dei muscoli senza coinvolgimento del sistema nervoso; in particolare i pazienti presentano un'insorgenza precoce di retrazione a carico dei gomiti, delle anche, dei tendini d'Achille e della colonna cervicale, compromissione e debolezza dei muscoli omero-peroneali (Fig.1). Gli individui EDMD presentano inoltre una cardiomiopatia con difetto di conduzione che causa rischio di morte improvvisa (Emery A.E., 2000).

L'EDMD si caratterizza per una notevole eterogeneità genetica: il primo gruppo di pazienti descritto era composto da soli maschi lasciando supporre una trasmissione ereditaria legata al cromosoma X (Emery A.E., 1966); fu infatti scoperto anni dopo che la mutazione causante la patologia era presente sul gene *EMD* localizzato sul braccio lungo del cromosoma X (Xq28) che codifica per l'emerina, una proteina ubiquitaria della membrana nucleare (Bione S., 1993). Studi successivi individuarono ulteriori mutazioni causa di EDMD in altri geni: Bonne e colleghi e Raffaele Di Barletta e colleghi scoprirono che mutazioni sul gene *LMNA* presente sul braccio corto del cromosoma 1 (1q2.1), che codifica per le lamine A e C, era responsabile di due forme di distrofia di Emery-Dreifuss (Bonne G., 1999; Raffaele Di Barletta M., 2001): l'EDMD di tipo 2 causata da mutazione autosomica dominante e l'EDMD3 causata da mutazione autosomica recessiva. Ulteriori forme di EDMD sono state successivamente associate a mutazioni in altri geni: la distrofia muscolare di Emery-Dreifuss tipo 4 (EDMD4) è causata da mutazione eterozigote sui geni *SYNE1* e *SYNE2* che codificano per le nesprine, proteine che legandosi all'emerina e alla lamina nucleare costituiscono un ponte funzionale e strutturale tra nucleoscheletro e citoscheletro (Zang Q., 2007). Altri geni associati a forme di distrofia muscolare di Emery-Dreifuss sono *SUN1*, *SUN2*, *TMEM43* e *FHL1* (Meinke P., 2014; Liang W.C. 2011, Gueneau L. 2009).



**Fig. 1 Fenotipo clinico di un paziente con EDMD.** La figura evidenzia il coinvolgimento muscolare a livello delle braccia e delle gambe, retrazione dei gomiti e dei tendini d'Achille, e cardiomiopatia. La foto del paziente evidenzia la retrazione dei gomiti e dei tendini d'Achille. (foto: Emery A.E. *Neuromuscul Disord.* 2000)

## 1.2 Quadro clinico delle diverse forme di distrofia muscolare di Emery-Dreifuss

La distrofia muscolare di Emery-Dreifuss presenta un quadro clinico eterogeneo a seconda del gene che ne è causa (L. Politano, comunicazione personale). Si distinguono tre principali alterazioni che caratterizzano questa patologia: in primis, contratture dei tendini d'Achille, dei gomiti e dei muscoli post-cervicali (la contrazione provoca una limitazione della flessione del collo che si protrae successivamente a tutta la spina dorsale) progressiva debolezza e atrofia muscolare inizialmente sviluppata a livello dell'area omero-peroneale (in alcuni individui EDMD inoltre l'atrofia muscolare si estende alla muscolatura prossimale dei cingoli (Ura S., 2007); difetti di conduzione cardiaca, causati da assenza di emerina nelle cellule cardiache, caratterizzati da precoce insorgenza di bradicardia con successiva paralisi atriale o blocco atrio-ventricolare (Emery A.D., 2000). Il coinvolgimento cardiaco in questa patologia è forse l'aspetto più importante: in pazienti con EDMD1 si manifesta una precoce bradicardia con evoluzione verso la paralisi atriale o blocco ventricolare, causando la morte per blocco cardiaco. L'impianto di un pacemaker o meglio di un

defibrillatore impiantabile si rende necessario per prevenire l'evento di morte improvvisa. Pazienti con EDMD2 hanno un interessamento cardiaco relativamente tardivo con disturbi del sistema di conduzione. Nei pazienti EDMD1 il rischio di morte improvvisa può sopraggiungere non solo per bradicardia ma anche per tachiaritmie. Il coinvolgimento cardiaco e quello muscolare non sono sempre correlati: sono stati infatti rilevati casi di EDMD con evidente cardiomiopatia in assenza di gravi alterazioni neuromuscolari (Voit T., 1988).

### **1.3 Ipotesi patogenetiche nella distrofia muscolare di Emery-Dreifuss**

#### **1.3.1 EDMD legata a mutazioni del gene *EMD* (EDMD 1)**

L'EDMD1 presenta un'incidenza 1:100000 ed è caratterizzata da indebolimento dei muscoli striati, contratture a livello dei tendini e difetti di conduzione cardiaca. La patologia è causata da mutazione del gene *EMD* che codifica per l'emerina. Il gene è composto da sei esoni e cinque introni ed è localizzato sul cromosoma X. La proteina è formata di 254 aminoacidi con un dominio nucleoplasmatico N-terminale di 220 aminoacidi, un dominio trans-membrana di 23 aminoacidi e 11 residui del dominio luminale ed è localizzata all'interno della membrana nucleare interna attraverso il dominio idrofobico C-terminale. L'emerina è implicata nella regolazione dell'espressione genica, nel signaling cellulare e nucleare e nell'architettura cellulare (Koch A.J., 2012, Manilal S., 1999). L'emerina e la lamina A si legano direttamente al complesso di legame nucleoscheletro-citoscheletro (LINC complex) attraverso la connessione con la nesprina e le proteine SUN1 e SUN2. Il LINC complex connette fisicamente il citoscheletro al nucleo: la nesprina e le proteine SUN sono localizzate anche sulla membrana mitocondriale esterna ed interna e creano un ponte di connessione tra le proteine e del lume nucleare e le componenti del citoscheletro quali l'actina e i microtubuli. Il legame che si forma genera forze meccaniche tra la membrana cellulare, il citoplasma e il nucleo, oltre a garantire una corretta dimensione dei nuclei e del loro posizionamento in

miofibre mature (Zhang Q., 2007; Lombardi M.L., 2011; Mattioli E., 2011; Meinke P., 2014). Meinke e colleghi, hanno dimostrato che mutazioni nel gene che codifica per SUN1, una delle proteine del LINC complex, provocano un'alterazione dell'interazione tra mionuclei e miocrotubuli causando difetti di posizionamento dei nuclei all'interno delle fibre muscolari (Meinke P., 2014). Questo suggerisce un possibile coinvolgimento di SUN1 e SUN2 anche nella patogenesi dell'EDMD1. L'assenza di emerina è responsabile di difetti della morfologia cellulare, come aumento della deformabilità cellulare e riduzione della vitalità cellulare dovuta a stress meccanici e alterazione dei meccanismi di meccanotrasduzione (Lammerding J., 2004 e 2005). L'emerina ha inoltre un ruolo fondamentale nel mantenimento dell'architettura nucleare: cellule di pazienti con EDMD1 mostrano una severa alterazione della forma del nucleo nel 25% dei fibroblasti e delle cellule muscolari scheletriche e lisce (Fidziańska A., 2003).

Insieme alle proteine LAP2 $\alpha$  e MAN1, l'emerina forma un complesso proteico di legame nucleoscheletro-DNA (dominio-LEM) mediato dalla proteina BAF (barrier to autointegration factor) (Margalit A., 2007, Segura-Totten M., 2004): questo complesso proteico legato alla lamina nucleare agisce legando la cromatina all'involucro nucleare in maniera dinamica. Mutazione o perdita di emerina sono eventi che causano la deregolazione delle vie di segnalazione cellulare contribuendo allo sviluppo del fenotipo EDMD, come è stato dimostrato trattando con inibitori del signaling di ERK1/MAPK modelli murini di EDMD2 (Muchir A., 2012).

### **1.3.2 EDMD legata a mutazioni del gene *LMNA* (EDMD 2 e 3)**

L'EDMD2 ha un'incidenza non ben definita ed è causata da mutazione del gene *LMNA* che codifica attraverso splicing alternativo due maggiori prodotti proteici, la lamina A di 72 kDa e la lamina C di 67 kDa costituenti la lamina nucleare (Dyer J.A., 1999). La lamina A viene sintetizzata a partire da un precursore, la prelamina A, che attraverso fasi di isoprenilazione, metilazione e taglio a livello del dominio C-terminale, viene convertita in proteina matura (Sinensky M., 1994). Le lamine



appartengono alla famiglia dei filamenti intermedi e si identificano strutturalmente per la presenza di un dominio coiled-coil ad  $\alpha$ -elica, un dominio N-terminale ed uno C-terminale. Singole molecole di lamina si associano in dimeri attraverso il dominio ad  $\alpha$ -elica producendo una struttura definita coiled-coil e successivamente si associano ad altri dimeri tramite i domini terminali formando così una rete di filamenti intermedi che costituisce la lamina nucleare, costituente essenziale dell'involucro nucleare. La lamina nucleare svolge varie funzioni solo in parte definite. Tra queste, una funzione di sostegno strutturale del nucleo e, grazie al legame con proteine quali MAN1, LAP2 $\alpha$  ed emerina, una funzione di ancoraggio della cromatina e del citoscheletro. Mutazioni a carico del gene *LMNA* sono causa di due forme di distrofia muscolare di Emery-Dreifuss: autosomica dominante definita come distrofia muscolare di Emery-Dreifuss di tipo 2 (EDMD2); autosomica recessiva o di tipo 3 (EDMD3). La EDMD2 è la forma più frequente di EDMD: sono state individuate circa 200 mutazioni sul gene che codifica per la lamina A/C distribuite lungo tutti i nove esoni che formano il gene. Mutazioni a carico del gene *LMNA* sono state inoltre individuate in famiglie di pazienti con cardiomiopatia dilatativa autosomica dominante con difetto di conduzione (DCM-C) senza coinvolgimento dei muscoli scheletrici e in pazienti con distrofia muscolare dei cingoli autosomica dominante con disturbi di conduzione atrioventricolare (LGMD1B) (Fatkin D., 1999; Muchir A., 2000). Studi di immunocitochimica su biopsie di muscolo scheletrico di pazienti EDMD2 con mutazioni del gene *LMNA* non mostrano delle significative alterazione dell'involucro nucleare, mentre una tipica struttura a nido d'ape (honeycomb structure) si evidenzia in fibroblasti EDMD1 o EDMD2 in coltura marcati con anticorpi contro lamina A/C o emerina. Sono state evidenziate inoltre delle alterazione nella distribuzione della cromatina sia in cellule che in tessuti. Mutazioni della lamina A/C in mioblasti di pazienti sono stati collegati ad un aumento di senescenza e di alti livelli di citochine infiammatorie quali IL-6 e IL-8 (Moiseeva O., 2011). Mutazioni a carico del gene *LMNA* hanno inoltre ripercussioni sul differenziamento miogenico nell'EDMD2: la mancata espressione di prelamina farnesilata causa

un'alterata localizzazione di SUN1 e di conseguenza il mancato reclutamento di SUN2: queste due proteine sono responsabili del corretto posizionamento dei mionuclei nelle fibre muscolari. Questa serie di alterazioni a livello dei mionuclei di miotubi umani EDMD2 si traducono in una alterazione delle fibre muscolari con una clasterizzazione dei nuclei al loro interno (Mattioli E., 2011).

#### **1.4 Il ruolo delle citochine nelle distrofie muscolari**

Diversi studi in pazienti colpiti da distrofie muscolari hanno evidenziato un coinvolgimento di fattori circolanti quali citochine, chemochine e fattori di crescita nello sviluppo di alterazioni patologiche in diversi tessuti. Le citochine influenzano il differenziamento del tessuto muscolare, scheletrico, adiposo e generano inoltre fenomeni infiammatori nei tessuti colpiti. Rufo e colleghi hanno osservato alterazioni del fenotipo osseo in pazienti con Distrofia muscolare di Duchenne (DMD) e in topi con assenza del gene della distrofina (topi mdx), e hanno riportato un ruolo delle citochine circolanti nel riassorbimento osseo, indicando l'IL-6 come principale effettore sistemico responsabile (Rufo A., 2011). Nella DMD, NF-kB gioca un ruolo attivo nell'induzione dei geni del TNF $\alpha$  e dell'IL-1 $\beta$  ed è attivata in risposta a molecole infiammatorie come l'IL-6 e TNF $\alpha$ . Queste citochine insieme a NF-kB e IFN $\gamma$  risultano aumentate nella DMD (Hnia K., 2008, Stuerenburg HJ., 1999 e Chahbouni M., 2010) in correlazione allo stato infiammatorio. Oltre alle più comuni citochine proinfiammatorie che sono state associate a stati infiammatori nelle distrofie muscolari quali il TNF $\alpha$  e l'IL-6, un'ulteriore possibile attivatore di stati infiammatori nella DMD è stato descritto da De Pascale e colleghi. Si tratta dell'IL-17 che risulta aumentata in associazione con aumentati livelli di TNF $\alpha$  e MCP-1, contribuendo in questo modo allo sviluppo di uno stato infiammatorio cronico a livello muscolare (De Pasquale L., 2012). L'utilizzo di melatonina è stato suggerito come possibile anti-infiammatorio nella DMD: il trattamento di pazienti con melatonina riduce l'attivazione di NF-kB e la produzione di citochine infiammatorie come IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  riducendo lo stato infiammatorio in tessuto muscolare DMD (Chahbouni M., 2010).

Effetti mediati da NF-kB sono stati direttamente associati a mutazioni della lamina A/C da Osorio e colleghi in modelli di progeria di Hutchinson-Gilford (HGPS). Lo studio ha evidenziato come in topi HGPS recanti una mutazione del gene *Lmna* responsabile della trascrizione di una prelamina mutata denominata progerina, sia iper-attivata la via di segnalazione di NF-kB che causa aumento dell'infiammazione grazie alla produzione di citochine infiammatorie come IL-6 e TNF $\alpha$ . L'attivazione del pathway infiammatorio ha come conseguenza un invecchiamento accelerato associato ad uno stato infiammatorio nei tessuti (Osorio F.G., 2012).

Ulteriori studi riguardanti patologie causate da difetti della lamina hanno evidenziato un effetto delle citochine a carico del tessuto scheletrico. Avnet e colleghi hanno dimostrato che l'aumento di secrezione di TGF $\beta$ 2 da parte di osteoblasti di pazienti con displasia mandibuloacrale di tipo A (MADA) favorisce il differenziamento degli osteoclasti e il riassorbimento osseo, un effetto che può essere inibito utilizzando un anticorpo neutralizzante per il TGF $\beta$ 2 (Avnet S., 2011). Le proprietà e le funzioni biologiche delle principali citochine, coinvolte nelle distrofie muscolari, saranno descritte nei paragrafi successivi.

## **1.5 Proprietà delle citochine**

Le citochine sono proteine a basso peso molecolare che secrete in risposta a stimoli di varia natura, possono generare risposte come quella immunitaria, o indurre attività cellulari quali il differenziamento, la crescita o la morte cellulare. La loro azione avviene attraverso il legame con recettori posti sulla membrana delle cellule bersaglio, attivando così vie di trasduzione del segnale che vanno ad agire sull'espressione genica delle cellule stesse (Nicola N.A., 1994). Questi recettori vengono classificati in 5 famiglie che differiscono per struttura e trasduzione del segnale:

1. la famiglia dei recettori di classe I che legano le emopoietine e usano una via di trasduzione mediata da JAK e STAT;
2. la famiglia dei recettori di classe II che legano l'IFN e l'IL10;
3. la superfamiglia dei recettori delle immunoglobuline, che comprendono i due recettori dell'IL-6;

4. i recettori a sette  $\alpha$ -eliche trans membrana, che legano le chemochine;
5. la famiglia di recettori per i fattori di necrosi tissutale (TNF).

Le citochine possono avere un effetto autocrino modificando il comportamento della stessa cellula che l'ha secreta attraverso il legame con recettori presenti sulla membrana; hanno invece un effetto di tipo paracrino quando si legano a recettori di cellule adiacenti alla cellula secernente. Alcune citochine possono invece agire in modo endocrino, legandosi a cellule bersaglio molto distanti da loro. Le citochine presentano proprietà specifiche che permettono di attivare risposte in maniera sinergica ed organizzata. Una determinata citochina può infatti agire in modo differente in diversi tipi cellulari grazie alla sua proprietà pleiotropica; si può inoltre avere un'azione amplificata di due o più citochine sullo stesso bersaglio per effetto della loro ridondanza. La proprietà sinergica permette a due diverse citochine di avere un effetto rafforzato rispetto all'azione di una singola citochina. Infine l'azione antagonista di una citochina può inibire o controbilanciare gli effetti di un'altra citochina (Moraga I., 2014). Una più dettagliata descrizione delle citochine maggiormente coinvolte nei fenomeni infiammatori e nello sviluppo e differenziamento cellulare nelle distrofie sarà discusso nei paragrafi seguenti.

### **1.5.1 Interleuchina 6 (IL-6)**

Interleuchina 6 (IL-6) è una citochina pleiotropica, prodotta da diversi tipi di linfociti svolgendo un ruolo importante in un'ampia serie di risposte quali reazioni immunitarie, reazioni di fase acuta ed ematopoiesi (Hirano T., 1992, 1998). IL-6 è prodotta da una varietà di tipi di cellule, come macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali, osteoblasti, condrociti. Il recettore per IL-6 consiste di due subunità: la catena  $\alpha$  (IL-6R), una glicoproteina transmembrana di 80 kDa che lega IL-6 con bassa affinità, e la catena  $\beta$  (gp130), una glicoproteina transmembrana di 130 kDa che si lega all'eterodimero IL-6-IL-6R per costituire il segnale ad alta affinità. La produzione di IL-6 è regolata da una varietà di stimoli; è indotta in linfociti T o cloni di linfociti T stimolati da mitogeni o antigeni. I principali induttori

fisiologici di IL-6 sono due citochine tipicamente pro-infiammatorie, il TNF e l'interleuchina-1 (IL-1). L'IL-6 è nota per le sue proprietà infiammatorie e l'aumento dei suoi valori in diverse patologie è associato ad uno stato di infiammazione cronica. Alti livelli di IL-6 sono stati riscontrati nella DMD contribuendo allo sviluppo di infiammazione cronica e a ritardo nella rigenerazione muscolare. L'aumento di espressione di IL-6 e TNF $\alpha$  correlato al danno muscolare da necrosi e mancata rigenerazione è proporzionale all'età in pazienti DMD (Messina S., 2011). L'aumento di IL-6 è stato correlato al riassorbimento osseo in pazienti EDMD e in topi con assenza del gene della distrofina (topi mdx) (Rufo A., 2011). Approcci farmacologici sono stati utilizzati per ridurre lo stato infiammatorio nelle distrofie muscolari: trattamenti con melatonina o resveratrolo hanno evidenziato una riduzione dello stato infiammatorio in pazienti DMD topi mdx; lo studio ha evidenziato una riduzione di citochine infiammatorie tra cui l'IL-6 correlato ad un miglioramento delle condizioni patologiche (Hori Y.S., 2011, Chahbouni M., 2010).

### **1.5.2 Interferone $\gamma$ (IFN $\gamma$ )**

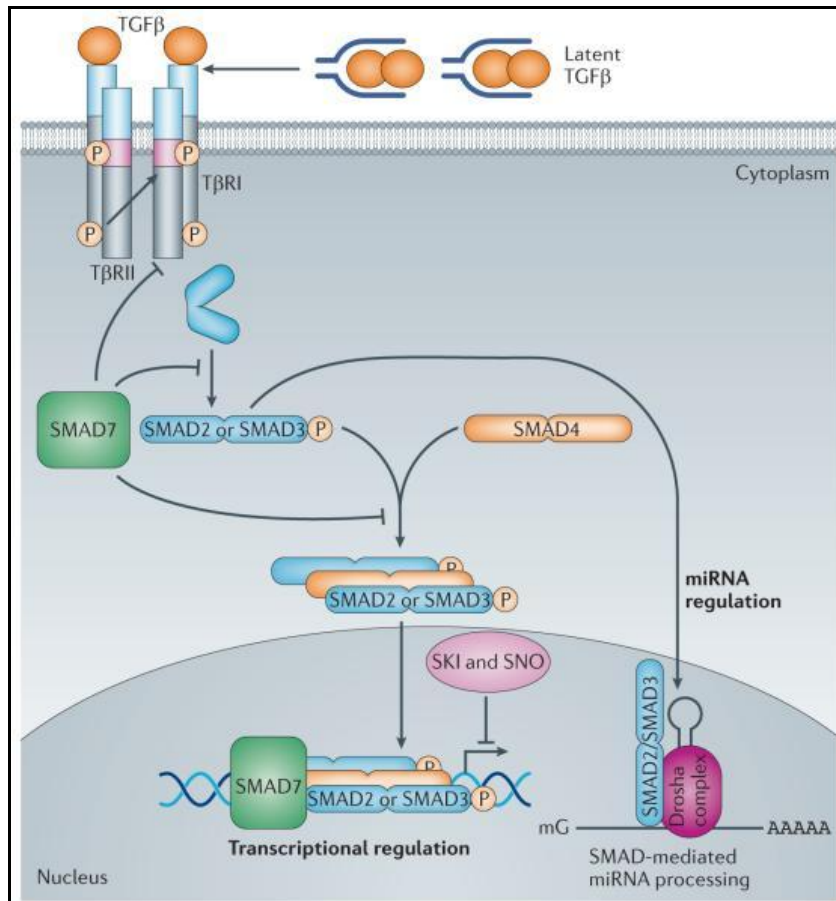
L'interferone  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) è prodotto principalmente da linfociti attivati e ha recettori su praticamente tutti i tipi di cellule dell'organismo. Questa citochina esercita una moltitudine di effetti biologici cellulari. L'IFN $\gamma$  è il principale attivatore dei macrofagi ed in aggiunta ha un ruolo nell'attivazione delle cellule endoteliali. Queste due attività in associazione fanno attribuire all'IFN $\gamma$  un ruolo da citochina infiammatoria. Il ruolo regolatore sulle fasi antigeniche specifiche della risposta immunitaria derivano invece dai suoi effetti sulle cellule presentanti l'antigene (APC) e sui linfociti T e B. Il precursore dell'IFN $\gamma$  umano consiste di 166 aminoacidi; dopo la rimozione del peptide segnale, la forma matura generata presenta un peso molecolare di circa 17,1 kDa. IFN $\gamma$  è una citochina prodotta quasi esclusivamente da sottopopolazioni di linfociti T helper 1 (Th1) e da cellule NK (Alzona M., 1994). *In vivo*, l'IFN $\gamma$  è prodotto in tessuti infiltrati da linfociti attivati, in particolare nei focolai di infiammazione acuta dovuta a risposte immunitarie antigeniche-specifiche, e in organi linfoidi periferici

durante l'infiammazione locale o generale. L' $\text{IFN}\gamma$  una volta prodotto in una zona del corpo è in grado di entrare nel sangue ma viene rapidamente eliminato: in questo la citochina diventa rilevabile nel siero solitamente in piccole concentrazioni e per una durata relativamente breve. È stato evidenziato un aumento dei valori di  $\text{IFN}\gamma$ ,  $\text{TNF}\alpha$ , IL-2 e IL-6 come conseguenza di uno stato infiammatorio a livello muscolare in pazienti affetti da DMD: l'utilizzo di melatonina come antinfiammatorio riduce i livelli delle citochine e di conseguenza limita i processi iperossidativi e infiammatori in pazienti DMD portando ad un miglioramento dei processi degenerativi del muscolo (Chahbouni M.J., 2010). In modelli murini di DMD è stato inoltre evidenziato come l' $\text{IFN}\gamma$  aumenta l'attivazione dei macrofagi di tipo M1 che ha un'azione pro-infiammatoria peggiorando il fenotipo distrofico e riducono l'espressione di macrofagi con azione pro-rigenerativa di tipo M2 causando un'infiammazione prolungata nei tessuti muscolari e un peggioramento del fenotipo distrofico (Villalta S.A., 2011).

### **1.5.3 TGF $\beta$**

La superfamiglia del TGF $\beta$  rappresenta una grossa famiglia di citochine pleiotropiche: Nei mammiferi sono presenti queste isoforme: TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, e TGF $\beta$ 3. Queste citochine sono codificate ognuna da uno specifico gene, in maniera tessuto-specifica e in dipendenza dallo sviluppo. Il TGF $\beta$ 1 è specifico delle cellule endoteliali, ematopoietiche e del tessuto connettivo; il TGF $\beta$ 2 è prodotto principalmente nelle cellule neuronali ed epiteliali, mentre il TGF $\beta$ 3 viene espresso nelle cellule mesenchimali (Massagué J., 1990). Le tre isoforme hanno sequenze altamente conservate con un'omologia del 70-80%. Il TGF $\beta$ 1 è secreto nella matrice extracellulare come complesso proteico latente, legato a proteine associate allo stato di latenza e ad una delle quattro isoforme di proteine leganti il TGF $\beta$ 1 latente. L'attivazione del TGF $\beta$ 1, che è necessaria per la sua attività biologica prevede la processazione proteolitica delle proteine associate al fattore e il rilascio del fattore stesso (Sinha S., 1998). Nella forma attiva questo fattore ha un peso molecolare di 25 kDa ed è composto da due catene polipeptidiche di 112 amminoacidi, ciascuna contenente sette residui di Cys

altamente conservati, sei dei quali formano una struttura nota come “nodo di cisteine” (Massagué J., 1998), mentre il settimo forma un ponte disolfuro con il corrispondente residuo di cisteina dell'altra catena polipeptidica. Il TGFβ2 é formato da due subunità collegate da un ponte disolfuro; ogni subunità è una catena a singola elica di 112 residui con un peso molecolare di 12,72 kDa con un'omologia del 71,4% rispetto al TGFβ1 (Marquardt H., 1987). Una volta attivate, le varie isoforme del TGFβ possono regolare i processi cellulari, attraverso il legame a tre tipi di recettori di superficie altamente affini, oppure ad altre molecole di superficie: il recettore di tipo I (TβRI), il recettore di tipo II (TβRII), il recettore di tipo III (betaglicano) e le endogline (Fig. 2 ). L'azione del TGFβ si attua attraverso il legame di un dimero di citochine ai recettori di tipo I e II e la successiva attivazione di complessi proteici Smad che agiscono come fattori trascrizionali regolando geni target (Akhurst R.J e Hata A. 2012). Altre vie di segnale a valle del legame TGFβ-recettore sono quelle dipendenti da PI3-chinasi/AKT o MAP-chinasi/ERK.

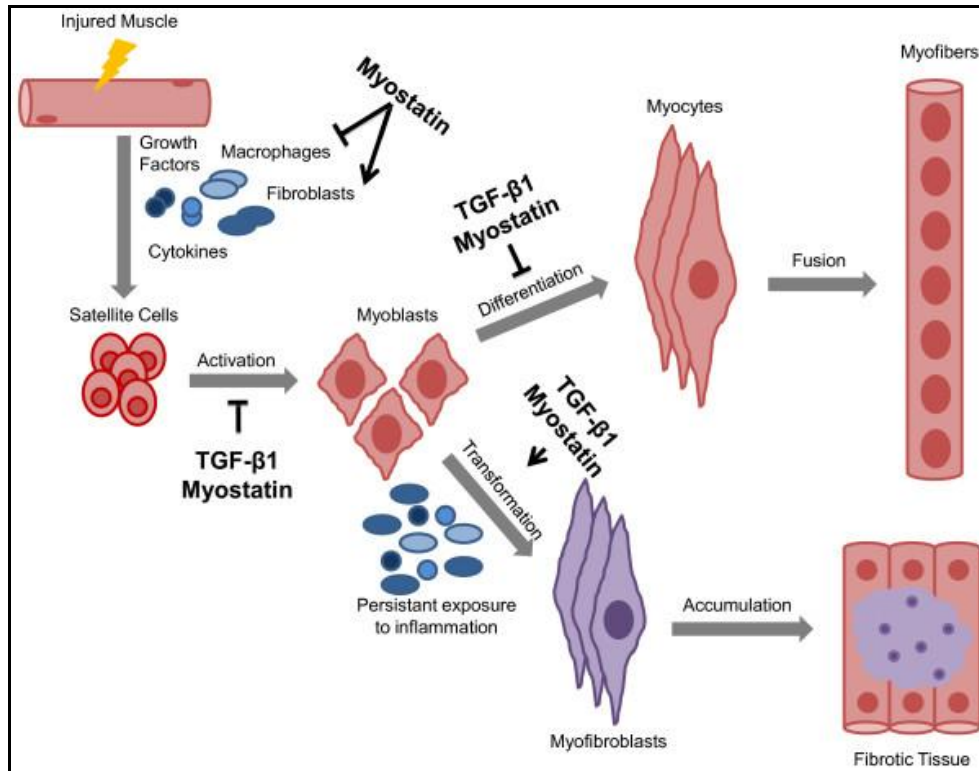


**Fig. 2 Pathway di segnalazione del TGFβ.** Il legame del TGFβ al subunità TβRI provoca la formazione di un complesso eteromero con la subunità TβRII: questo causa la fosforilazione del recettore di tipo I che a sua volta fosforila delle proteine smad che portano alla traslocazione nucleare di un complesso di proteine smad le quali legandosi al DNA regolano la trascrizione dei geni target. (Akhurst R.J e Hata A. *Nat Rev Drug Discov.* 2012).

Le tre isoforme di TGFβ svolgono un ruolo importante nella regolazione delle principali funzioni delle cellule come la proliferazione, lo sviluppo, il differenziamento, la migrazione, l'adesione cellulare, l'espressione delle proteine della matrice extracellulare (ECM), l'apoptosi e la riparazione delle ferite (ten Dijke P. e Hill C.S., 2004). Alterazioni della produzione e della trasduzione dei segnali di alcuni membri della superfamiglia del TGFβ sono importanti fattori patogenetici implicati in anomalie dello sviluppo e in varie patologie umane inclusi il cancro, le fibrosi e le patologie autoimmuni. I membri della famiglia del TGFβ hanno inoltre un ruolo nell'insorgenza della fibrosi, uno dei principali fattori patogenetici nelle distrofie muscolari (Burks and Cohn, 2011)(Fig 3 ). Il TGFβ1 è una delle citochine che



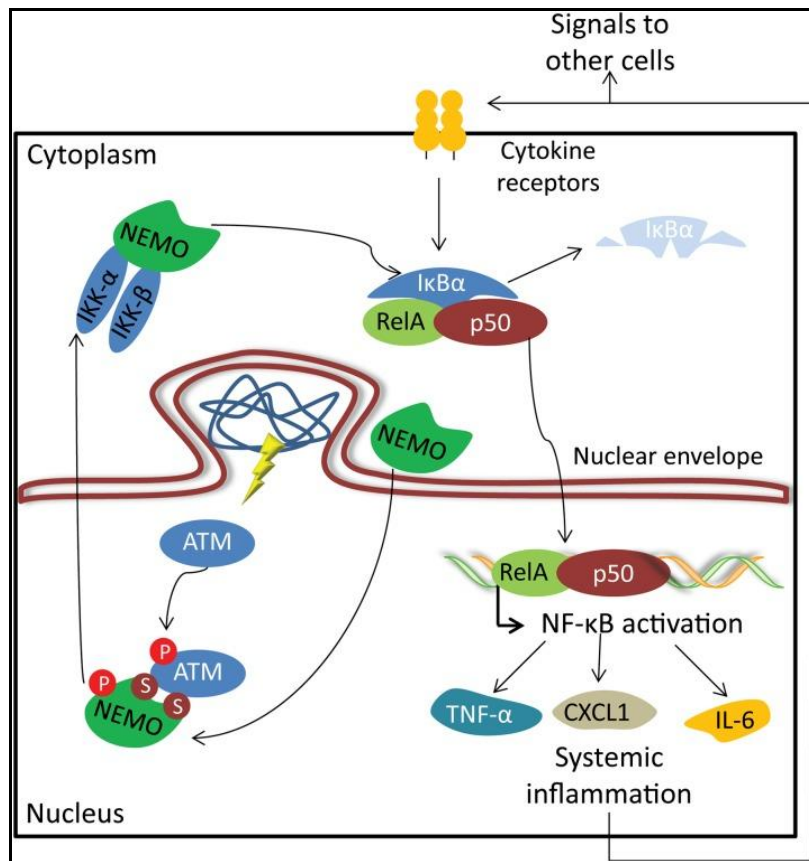
maggiormente inducono fibrosi nelle distrofie muscolari; esso inoltre risulta aumentato nel tessuto muscolare di pazienti con DMD (Yamazaki M., 1994, Burks T.N., Cohn R.D, 2011) e in modelli animali di DMD, LGMD2B e in alcune distrofie muscolari congenite (Onofre-Oliveira P.C., 2012).



**Figura 3 Fasi della rigenerazione muscolare normale e irregolare.** Nella rigenerazione muscolare di fibre normali si ha una risposta infiammatoria temporanea successiva ad un trauma attraverso chemotassi di citochine, fattori di crescita, macrofagi e fibroblasti. A questo evento segue l'attivazione e la proliferazione di cellule satellite dalle quali hanno origine i mioblasti che differenzieranno in miotubi. Nella rigenerazione muscolare irregolare si ha una persistente risposta infiammatoria a causa di una ipersecrezione di TGFβ1 e miostatine che provoca la trasformazione dei fibroblasti in miofibroblasti, la formazione di tessuto fibrotico e la mancata rigenerazione muscolare. (Burks and Cohn *Skeletal Muscle*, 2011)

#### **1.5.4 Fattore di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ )**

Il TNF $\alpha$  è una proteina che esiste sia in forma solubile (157 aminoacidi) che in forma transmembrana (233 aminoacidi) e viene prodotta principalmente dai macrofagi in risposta a differenti stimoli infiammatori. Essa media la sua azione attraverso due distinti recettori, il primo definito p60 e l'altro p80. È stato suggerito come, seppur sia necessario per la protezione contro le infezioni batteriche, il TNF $\alpha$  modula anche la crescita cellulare, la replicazione virale, nonché regola il sistema immunitario in corso di shock settico, malattie autoimmuni, artrite reumatoide, flogosi e diabete. Il TNF $\alpha$  nella sua forma matura è un peptide di 157 aminoacidi del peso di 17 kDa; in condizioni native, tuttavia, il TNF $\alpha$  è un trimero con una massa molecolare di circa 50 kDa (Aggarwal B.B., 1985). Il TNF $\alpha$  è prodotto da un'ampia varietà di tipi cellulari che comprendono: monociti e macrofagi, linfociti T, linfociti B, astrociti, fibroblasti, basofili, mastociti, le cellule NK, cellule di Kupffer, cellule della muscolatura liscia, cellule epidermiche (Aggarwal B.B. e Vilcek, 1992). La trascrizione del TNF $\alpha$  è in parte dipendente, dall'attivazione di NF-kB (Clarke C.J., 1998) ed è regolata da intermedi reattivi dell'ossigeno (ROS). Inibitori dell'attivazione di NF-kB (IL-10, IL-4, IL-11, IL-13, ormone melanocita stimolante, etc) e antiossidanti (superossido dismutasi, glutamil cisteina sintetasi) riducono l'espressione di TNF $\alpha$  (Foxwell B., 1998). TNF $\alpha$  è una citochina dotata di pleiotropismo che produce diverse risposte immunologiche e infiammatorie nell'organismo. In topi progerici, l'accumulo di progerina provoca l'attivazione di NF-kB da parte della subunità NEMO del complesso inibitore della chinasi kB (IKK) (Fig. 4): questo evento provoca l'attivazione di un programma infiammatorio attraverso la secrezione di IL6, CXCL1 e TNF $\alpha$  (Osorio F.G., 2012).



**Figura 4 Pathway di infiammazione sistemica causata da accumulo di prelamin A.** L'accumulo di prelamin A attiva un pattern di fosforilazione che a sua volta attiva NF-κB: l'evento genera una cascata infiammatoria attraverso la produzione di TNF $\alpha$ , IL-6 e CXCL1 (Osorio et al., *Genes & Development* 2012).

## 1.6 Studio delle citochine tramite Bio-Plex Multiplex System

Con il nostro studio abbiamo ritenuto necessario analizzare le citochine come potenziali biomarcatori per uno stato patologico e come indicatori per l'intervento terapeutico nella distrofia muscolare di Emery-Dreifuss. Ciononostante, l'analisi delle singole citochine non rappresenta bene la complessità delle loro interazioni a livello cellulare. Questo perché è importante contestualizzare il dosaggio della citochina all'interno della sua rete di interazioni con le altre citochine, per poter interpretare correttamente il dato dal punto di vista biologico. A tal fine è stata effettuata una valutazione simultanea della concentrazione delle citochine, attraverso un sistema di analisi multipla: il Bio-Plex Multiplex System è un sistema

integrato per analisi quantitative di analiti composto da un lettore a doppio laser per micropiastre da 96 pozzetti e da un programma informatico di controllo ed analisi dei dati. Il sistema si basa sulla tecnologia del saggio multiplo (Luminex xMAP), secondo il principio della citometria a flusso, che consente di analizzare contemporaneamente decine di analiti in una vasta gamma di campioni biologici come, siero e plasma, urina, lisati di tessuti e colture tissutali, sovranatanti di colture cellulari. Questa tecnologia ad alta sensibilità può impiegare fino a 100 insiemi di diverse microsfere di polistirene del diametro di 5,6  $\mu\text{m}$ . Ogni set di microsfere é marcato all'interno dalla combinazione di due fluorofori, a spettro di emissione distinto, in rapporti variabili e ciascun fluoroforo può avere uno dei 10 possibili livelli di fluorescenza, generando così una famiglia di 100 combinazioni di microsfere. Grazie alla separazione delle singole microsfere e alla loro attivazione da parte di un laser di localizzazione, permette di distinguere le diverse microsfere dopo che queste sono state miscelate insieme e aggiunte al singolo campione. Le microsfere diversamente marcate possono essere precedentemente coniugate a proteine, peptidi, anticorpi attraverso reazioni chimiche covalenti stabili. Per l'analisi delle citochine le microsfere sono coniugate ad anticorpi monoclonali specifici per una determinata citochina bersaglio. Il saggio multiplo consente di analizzare contemporaneamente diverse proteine in un singolo campione tramite l'utilizzo di gruppi di microsfere accoppiate a diversi anticorpi preordinati. Le microsfere coniugate vengono fatte reagire, in una micropiastre, con il campione ed un anticorpo secondario che funziona da detection, come avviene per un saggio immunologico. Questi anticorpi secondari sono marcati con un terzo fluoroforo, solitamente ficoeritrina, dalle proprietà spettrali differenti rispetto a quelle dei due utilizzati per l'identificazione della biglia, eccitato da un secondo laser del sistema. Il saggio avviene all'interno di un lettore nel quale le biglie eccitate vengono lette da due canali laser, passando in singola fila attraverso un capillare di quarzo (sistema di rilevazione ottico-elettronico). Quando il diodo nella lunghezza d'onda del rosso (635nm) eccita una biglia, questa viene identificata dal software di analisi relativamente al bersaglio verso il quale è

diretto l'anticorpo che vi è coniugato. In questo modo è possibile distinguere i diversi saggi combinati all'interno di un singolo campione. Simultaneamente, un laser (532nm) (Reporter channel) eccita la biglia in modo da rilevare il segnale della ficoeritrina coniugata all'anticorpo secondario: l'intensità del segnale nella lunghezza d'onda del verde è proporzionale alla quantità di antigene catturata dall'anticorpo secondario. I risultati quantitativi forniti dai saggi vengono interpretati dal software Bio-Plex Manager: questo programma consente l'analisi completa dei dati, indicando per ogni pozzetto la deviazione standard, il coefficiente di variazione, il valore di recovery sugli standard e sui controlli positivi, il numero totale di microsferette lette, il numero di microsferette singole correttamente riconosciute e la percentuale di aggregati presenti.

Il saggio immunologico in sospensione mostra dei vantaggi rispetto ai classici saggi basati sul legame di proteine su un supporto solido come ad esempio avviene con gli array bidimensionali e microarray di proteine. In primo luogo, il saggio Bio-Plex necessita di una piccola quantità di volume che si attesta solitamente intorno ai 50µl totali: questo permette di analizzare decine di analiti utilizzando minime quantità di campione. Questo aspetto risulta essere molto importante per analisi di campioni particolarmente difficili da reperire. Un secondo vantaggio è l'analisi della fluorescenza intrinseca della singola biglia che di fatto rende la determinazione della fluorescenza media in un singolo campione equivalente a centinaia di determinazioni effettuate mediante saggi alternativi come l'ELISA permettendo un'elevata accuratezza della misurazione. L'efficienza che deriva dalla capacità legante delle microsferette e dalla sensibilità del parametro di quantificazione garantisce un ampio range dinamico che può andare da 2 fino a 200000 pg/ml e permette di quantificare in parallelo, nello stesso campione, analiti presenti in concentrazioni molto elevate e molto basse, pur effettuando una medesima diluizione.

## **2. MATERIALI E METODI**

### **2.1 Raccolta siero di pazienti EDMD**

I campioni raccolti sono stati prelevati da diversi Istituti che collaborano all'interno del Network Italiano Laminopatie. In particolare, sono stati analizzati sieri di pazienti con distrofia muscolare di Emery-Dreifuss provenienti da: Ospedale Sant'Orsola – Cardiologia – Bologna, Istituto Neurologico Carlo Besta – Milano, Università di Pisa - Dipartimento di Neuroscienze – Pisa, Cardiomiologia e Genetica Medica - Seconda Università di Napoli, Università di Cagliari - Dip. di Scienze Cardiovascolari e Neurologia – Cagliari. I sieri dei pazienti provenienti dalla Cardiologia di Bologna sono stati da me processati nel Laboratorio di Biologia Cellulare e Muscoloscheletrica dell'Istituto Ortopedico Rizzoli. Per questo studio tutti i soggetti in esame hanno firmato il consenso informato. I sieri sono stati successivamente analizzati grazie alla collaborazione con l'Istituto Carlo Besta di Milano che ha provveduto alla misurazione dei valori delle citochine tramite Bioplex Cytokine Assay.

### **2.2 Processamento del siero da prelievo ematico**

- Il prelievo di sangue è stato raccolto in provette, senza anticoagulante, contenute un gel per la separazione del siero dalle cellule del sangue attraverso centrifugazione.
- Il sangue periferico all'interno delle provette è stato sottoposto a centrifugazione a 1300 rpm per 10 min.
- Il surnatante contenente il siero è stato raccolto e conservato a -80°.

### **2.3 Misurazione delle citochine tramite Bio-Plex Multiplex System**

Lo studio sulle citochine dei sieri di pazienti EDMD è stato effettuato con la collaborazione dell'Istituto Neurologico Carlo Besta di Milano. Per la quantificazione delle citochine sieriche è stata utilizzata la tecnologia ultrasensibile Pro human cytokine, chemokine, and growth factor assays (Bio-Rad, US). Il principio di tale dosaggio prevede un anticorpo specifico

coniugato a biglie in grado di emettere fluorescenza a diverse lunghezze d'onda. Sfruttando tale differenziazione, il detector è in grado di quantificare nello stesso campione di partenza molteplici citochine.

Sono stati utilizzati i kit della Bio-Rad Bio-Plex cytokine multiplex assay panel or single-plex assay (che includono le microsfere coniugate, il detection antibody e gli standard liofilizzati per la quantificazione delle specifiche citochine di interesse), con associati i relativi “Bio-Plex Cytokine Reagent kit” (che include l’assay buffer, il wash buffer, il diluente per il detection antibody, la streptavidina-PE, la piastra da 96 pozzetti) e “Bio-Plex Diluent kit” (che contiene il diluente per il campione di plasma ed il diluente per gli standard).

L’analisi delle citochine è stata valutata in 25 campioni di siero di pazienti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss, in correlazione all’analisi dei sieri di 22 soggetti controllo.

Per lo studio del TGF $\beta$  i campioni patologici analizzate risultano essere 38 (13 in più rispetto all’analisi delle altre citochine); questo è dovuto a due motivi: - l’analisi dei TGF $\beta$  si effettua con un kit specifico per questa citochina e non è incluso nel kit che comprende le altre citochine; - data la ridotta quantità di materiale a disposizione per alcuni campioni da analizzare si è data priorità all’analisi del TGF $\beta$ .

Per l’analisi è stato utilizzato un kit che ha permesso la misurazione in simultanea di 27 fattori circolanti:

- citochine: IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ;
- chemochine: Eotaxin, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , RANTES;
- fattori di crescita: Basic FGF, G-CSF, GM-CSF, PDGF-BB, VEGF.

Per la misurazione del TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3 è stato utilizzato il kit specifico Bio-Plex TGF- $\beta$  Assays della Bio-Rad. I campioni di siero sono stati diluiti 1:4 con sample diluent. Sono state effettuate le diluizioni seriali dello standard secondo la lettura laser a bassa sensibilità creando una curva di calibrazione. Sono state preparate le microsfere coniugate, per diluizione con assay buffer ed in assenza di luce. La piastra è stata prima lavata con

100  $\mu$ L di assay buffer per pozzetto.; successivamente sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di microsfele coniugate per pozzetto.

La piastra é stata lavata per 2 volte con 100  $\mu$ L di wash buffer per pozzetto. Sono stati aggiunti 50  $\mu$ L di standard e di plasma in ciascun pozzetto e la piastra é stata incubata per 30 minuti in agitazione a temperatura ambiente; al termine dell'incubazione sono stati effettuati 3 lavaggi con 100  $\mu$ L di wash buffer per pozzetto. Durante l'incubazione é stato preparato il detection antibody con il diluente apposito: 25  $\mu$ L ne sono stati aggiunti in ogni pozzetto e la piastra é stata incubata a per 30 minuti con agitazione a T.A: al termine dell'incubazione sono stati effettuati 3 lavaggi con 100  $\mu$ L di wash buffer per pozzetto. Successivamente é stata preparata la streptavidin-PE, diluendola con assay buffer: 50  $\mu$ L ne sono stati aggiunti ad ogni pozzetto e la piastra é stata incubata a T.A. per 10 minuti in agitazione. Dopo aver effettuato 3 lavaggi con 100  $\mu$ L di wash buffer per pozzetto sono stati infine aggiunti 125  $\mu$ L di assay buffer per pozzetto. Dopo averla agitata per 30 secondi in modo da risospendere le biglie, la piastra é stata inserita nello strumento di lettura. Alla termine della lettura da parte dello strumento, sono state ottimizzate le curve di calibrazione per ogni citochina in analisi. Le concentrazioni delle citochine sono state automaticamente calcolate dal programma Bio-Plex Manager software 4.1 (Bio-Rad, U).

## **2.4 Colture cellulari**

Le colture di fibroblasti umani utilizzati per gli esperimenti di condizionamento provenivano da controlli sani e da pazienti EDMD2. I fibroblasti sono stati mantenuti in coltura in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 10% di fetal bovine serum (FBS) e 1% di antibiotici. La coltura di C2C12 è stata allestita in terreno prelevato dai fibroblasti WT e EDMD2 dopo 72h in coltura. Le cellule condizionate sono state sottoposte a trattamento con anticorpi neutralizzanti specifici contro anti-IL6 (0,2  $\mu$ g/ml) e anti-TGF $\beta$ 2 (0,03 $\mu$ g/ml) per 72h. I mioblasti murini C2C12 trasfettati permanentemente con il gene *Lmna* con mutazione *Lmna-H222P* e con il gene *Lmna* WT sono stati forniti attraverso una collaborazione con il gruppo della prof.ssa Bonne dell'Institut de Myologie di Parigi; la



trasfezione delle C2C12 è stata eseguita e descritta da Choi e colleghi (Choi J. C. et al, 2012). I mioblasti trasfettati sono stati mantenuti in coltura per 72h in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) con 10% di fetal bovine serum (FBS) e 1% di antibiotici. Le cellule sono state sottoposte a trattamento con anticorpi neutralizzanti specifici contro anti-IL6 (0,2 µg/ml) e anti-TGFβ2 (0,03µg/ml).

## **2.5 Analisi di microscopia a fluorescenza**

Per l'analisi di microscopia a immunofluorescenza le cellule, al termine dei trattamenti, sono state fissate in paraformaldeide al 4% in PBS 1X per 10 minuti a temperatura ambiente; successivamente permeabilizzate in 0.15% Triton in PBS 1x per 5 minuti a temperatura ambiente. Dopo la saturazione con 4% siero albumina bovina (BSA) in PBS 1X le cellule sono state marcate con anticorpo anti-caveolina 3 (mouse monoclonal, BD Biosciences 610421) diluito 1:30 in Pbs 1X con 4% di siero albumina bovina (BSA) per 24h. La caveolina 3 è stata rilevata con anticorpo secondario anti-mouse FITC (San Cruz 2861) diluizione 1:100 per 1h. la miogenina è stata marcata con anticorpo primario anti-miogenina (rabbit polyclonal Santa Cruz SC-576) diluito 1:10 per 24h e rilevata con anticorpo secondario anti-rabbit TRIC (DAKO) diluito 1:100 1h. Le immagini sono state visualizzate con microscopio Nikon Eclipse E600 e fotografate con Nikon Digital Camera DXM1200. Le immagini digitali sono stati ottenute utilizzando il software NisElement AR 2.30 ( Nikon Corp., Tokyo , Giappone).

## **2.6 Analisi statistica**

L'analisi dei sieri dei pazienti EDMD e dei soggetti controllo è stata effettuata attraverso il test t di Student per confrontare le medie dei livelli di espressione di ogni citochine rispettivamente in pazienti e individui sani. I valori numerici sono espressi come media  $\pm$  deviazione standard. Il confronto dei parametri tra i tre gruppi sono stati fatti con un'analisi unidirezionale di test di varianza. I valori con  $P < 0.05$  e  $P < 0,01$  sono stati considerati statisticamente significativi. Per l'analisi statistica dei miotubi differenziati sono stati considerati miotubi con almeno tre mionuclei rispetto

a mioblasti in fase di differenziamento mononucleati (positivi alla miogenina); la conta effettuata in triplicato per ogni campione e stata successivamente formulata in valori percentuali delle medie. Il calcolo del t di Student delle medie è stato utilizzato per la valutazione statistica tra campioni. I valori con  $P < 0.05$  e  $P < 0,01$  sono stati considerati statisticamente significativi.

### **3 Risultati**

#### **3.1 Studio delle citochine in pazienti con EDMD**

Come descritto nei paragrafi precedenti la risposta immunitaria infiammatoria con conseguente produzione di citochine è stata associata ad un effetto sistemico in diverse distrofie in correlazione ad alterazioni nello sviluppo osseo e muscolare. Per analizzare l'effetto sistemico delle mutazioni da lamina è stata effettuata un'analisi dei sieri di un gruppo di pazienti affetti da EDMD. Lo studio era volto alla misurazione di un ampio spettro di citochine, chemochine e fattori di crescita attraverso un'analisi multiparametrica tramite la tecnologia del Bio-Plex Suspension Array System, che ha consentito di valutare un maggior numero di analiti rispetto alla classica analisi effettuata con saggio ELISA. Lo scopo era quello di individuare nuovi biomarcatori correlati alla patologia e possibili target di cura attraverso l'azione diretta sul pathways di attivazione delle citochine. L'analisi delle citochine è stata valutata in 25 campioni di siero di pazienti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss, in correlazione all'analisi dei sieri di 22 soggetti controllo. Nella tabella 1 sono state riportate le medie riferite alle concentrazioni delle citochine analizzate nei sieri. È bene ricordare che sebbene la tecnologia Bio-plex abbia consentito la valutazione di un ampio range di citochine nei pazienti bisogna registrare una difficoltà analitica derivante soprattutto da due aspetti non trascurabili riferibili alla materia di studio: in primo luogo, la carenza di dati pubblicati riferibili ad un'analisi completa di uno spettro di citochine nell'uomo che permetta di comparare con dei valori standard l'espressione delle citochine nell'individui analizzati. In secondo luogo, bisogna considerare che le variazioni di diversi parametri posso in qualche modo alterare i valori di espressione misurati: i tempi del prelievo ematico, la separazione del siero nel sangue, la conservazione dei campioni posso in qualche modo alterare le citochine del campione (De Jager W., 2009). Considerando che i campioni ematici provenivano da diversi laboratori è stata uniformata la metodica per il prelievo e la conservazione dei sieri (ora del prelievo, separazione del siero, crioconservazione a -80°).

L'analisi è proseguita con uno studio specifico di alcune citochine in fibroblasti di pazienti EDMD al fine individuare un'eventuale effetto tessuto-specifico di variazioni nei livelli di citochine. . Attraverso saggio ELISA si è analizzato il profilo di secrezione di due citochine: il TGFβ2, che come già evidenziato nei capitoli precedenti è coinvolto in diverse distrofie; l'IL-6 che come mostrato in diversi studi è al centro dei processi infiammatori in distrofie muscolari come la DMD.

### **3.2 Citochine in sieri e in fibroblasti di pazienti affetti da distrofia muscolare di Emery-Dreifuss**

L'analisi dei sieri di pazienti ha permesso di confrontare l'espressione delle principali citochine infiammatorie. Per semplificare la discussione dei risultati, i dati sono stati riferiti a quattro gruppi di citochine: citochine pro-infiammatorie, citochine anti-infiammatorie, chemochine e interleuchine.

Un primo set di citochine pro-infiammatorie comprendeva: IL-6, IL-1β, TNFα, IL-2, IL-8, IL-17, GM-CSF. Come evidenziato in tabella 1, non si evidenziano differenze di espressione per quasi tutte le citochine infiammatorie ad eccezione dell'IL-17 che risulta aumentata in tutti i pazienti EDMD (Fig. 5). Sebbene si osservi una eterogeneità di espressione nei pazienti EDMD (come evidenziato dalla deviazione standard), l'IL-17 presenta valori nettamente aumentati nei pazienti, in relazione al valore 0 presente nell'86% dei soggetti controllo analizzati, indicando una significatività dell'incremento dei valori. Nel gruppo di sieri EDMD esaminati, sono emersi due sottogruppi che presentavano un aumento di espressione differente di IL-17: il gruppo 1 (66% dei pazienti) presentava una media di 65,55 pg/ml, mentre il gruppo 2 (34% dei pazienti) una media di 1691,15 pg/ml (Fig.6b). I diversi livelli di secrezione di IL-17 non erano correlati ad età o sesso dei pazienti.

Il gruppo delle citochine anti-infiammatorie analizzate includeva: IL-10, TGFβ1, TGFβ2, TGFβ3, IL-4, IL-13 e INFγ. .

Nei sieri dei pazienti EDMD non sono stati osservati scostamenti rispetto alla media dei valori controllo per IL-10, IL-13. Un aumento di proteina circolante si evidenzia invece nel caso del TGFβ2, con un valore medio nei

pazienti EDMD di 2884,9 pg/ml rispetto ai controlli che mostrano un valore di 1140,21 pg/ml. E' importante notare che il livello di TGFbeta 2 risulta triplicato nel 39% dei pazienti, mentre solo il 18% dei pazienti che mostra valori simili ai controlli.

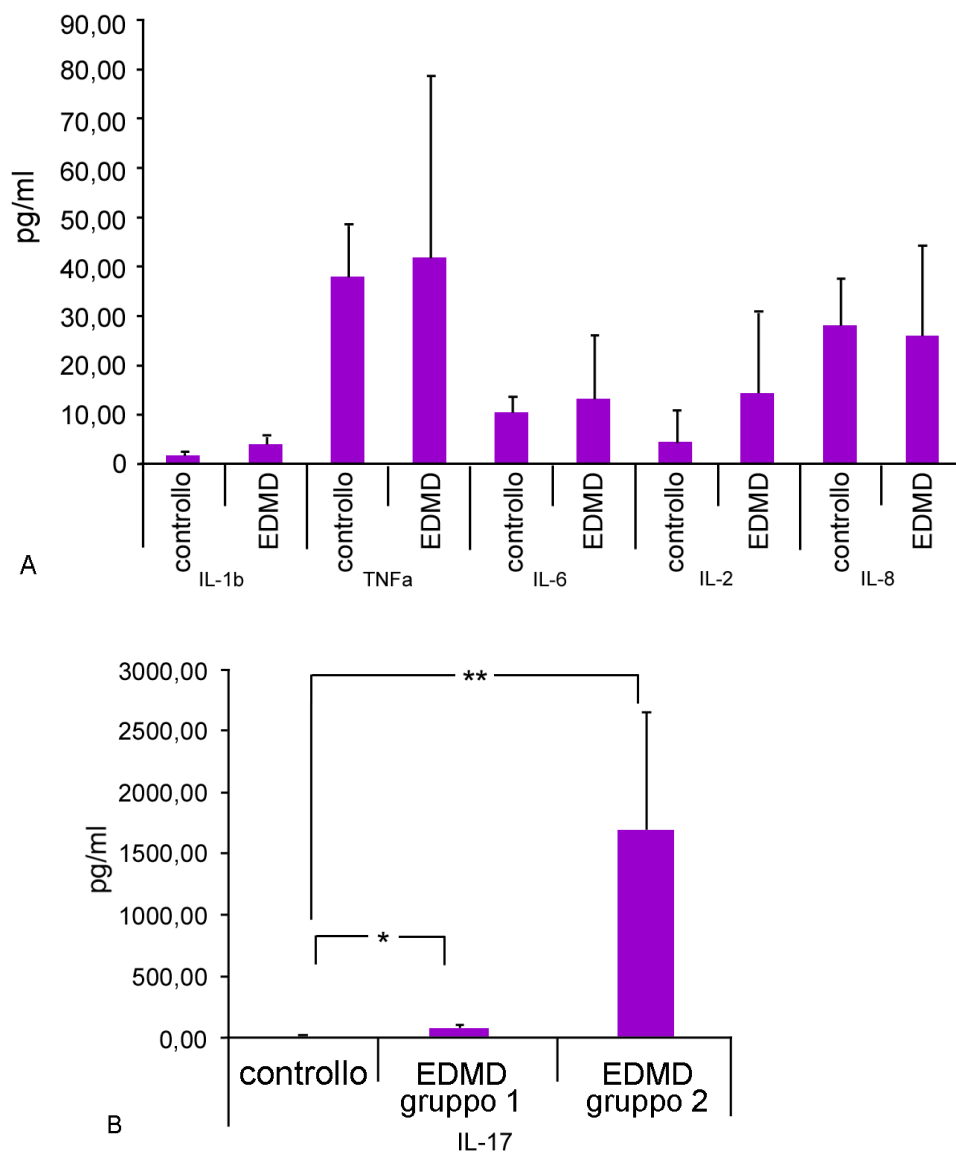
Un aumento di espressione nei sieri di pazienti EDMD è stato rilevato anche per altre due citochine proinfiammatorie, il TGFβ1 e l'INFγ (Fig. 6d).

L'analisi delle chemochine comprendeva MCP1, eotassina, MIP1α, MIP1β, RANTES (Fig. 8). Non sono state riscontrate delle variazioni rispetto ai controlli per quanto riguarda eotassina, MIP1α, MIP1β. Al contrario, è stata rilevata una drastica riduzione di RANTES in tutti i pazienti come evidenziato dalla media di valori e dall'andamento nei singoli pazienti (Fig. 8b). In maniera differente, una variazione dei valori di MCP-1 è stata registrata, con un aumento dei valori nel siero del 36% di pazienti EDMD.

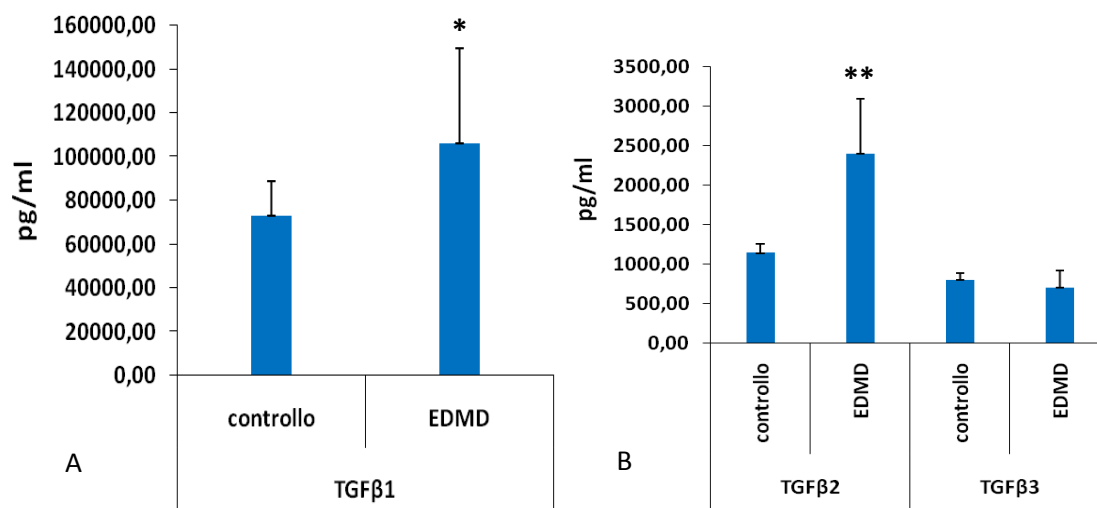
L'ultimo gruppo analizzato includeva le interleuchine: IL-1ra, IL-5, IL-7, IL-9, IL-12 e il fattore di crescita VEGF. Nessuna variazione rilevante è stata evidenziata per tutte le citochine ad eccezione del IL-1ra che presentava valori aumentati rispetto ai controlli ma non statisticamente significativi (Fig. 9); VEGF al contrario mostra una riduzione significativa del valore medio di espressione rispetto ai controlli con il 72% dei pazienti con valori minori di 100 pg/ml.

CITOCHINE	Siero controlli medie (pg/ml)	Siero EDMD medie (pg/ml)
IL-1 $\beta$	1,62 $\pm$ 0,89	3,81 $\pm$ 1,91
IL-1ra	80,55 $\pm$	634,48 $\pm$ 990,21
IL-2	4,29 $\pm$ 6,46	14,29 $\pm$ 17,78
IL-4	4,78 $\pm$ 0,72	6,68 $\pm$ 3,16
IL-5	7,19 $\pm$ 2,56	3,96 $\pm$ 7,38
IL-6	10,33 $\pm$ 3,13	12,99 $\pm$ 13,05
IL-8	27,97 $\pm$ 9,62	25,81 $\pm$ 18,45
IL-9	25,80 $\pm$ 13,37	39,57 $\pm$ 62,16
IL-10	10,42 $\pm$ 4,95	14,78 $\pm$ 12,06
IL-12 (p70)	34,52 $\pm$ 12,98	40,01 $\pm$ 26,63
IL-13	13,53 $\pm$ 4,49	9,24 $\pm$ 5,47
IL-17	2,65 $\pm$ 7,06	582,29 $\pm$ 935,19
TNF $\alpha$	37,41 $\pm$ 11,17	41,60 $\pm$ 37,11
TGF $\beta$ 1	72947,01 $\pm$ 15692,46	105947,99 $\pm$ 43771,22
TGF $\beta$ 2	1140,21 $\pm$ 114,07	2398,41 $\pm$ 697,51
TGF $\beta$ 3	798,45 $\pm$ 81,19	695,23 $\pm$ 216,26
IFN $\gamma$	117,81 $\pm$ 56,23	307,57 $\pm$ 259,1
GM-CSF	0,31 $\pm$ 1,44	0,0
MCP-1	79,72 $\pm$ 36,1	262,87 $\pm$ 370,86
MIP1 $\alpha$	6,82 $\pm$ 1,1	9,09 $\pm$ 3,56
MIP1 $\beta$	172,4 $\pm$ 52,79	168,37 $\pm$ 132,63
EOTAXIN	310,26 $\pm$ 18,10	344,12 $\pm$ 625,71
Rantes	189078,45 $\pm$ 57046,49	9549,64 $\pm$ 3255,27
VEGF	250,44 $\pm$ 124,81	120,94 $\pm$ 140,38

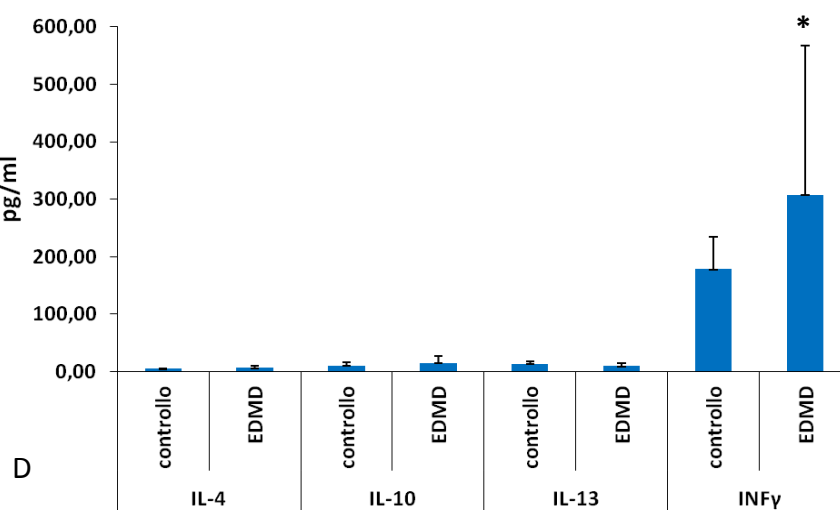
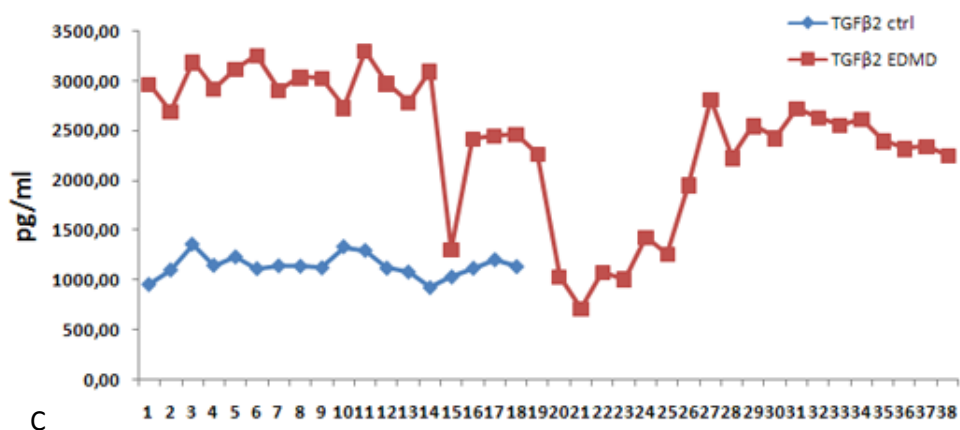
**Tab. 1 Livelli di citochine, chemochine e fattori crescita circolanti in sieri da pazienti EDMD e soggetti controllo (valore medio  $\pm$  deviazione standard).** Dall'analisi dei sieri è stata riscontrata una variazione statisticamente significativa delle citochine IL-17, TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, IFN $\gamma$  e della chemochina RANTES nei pazienti EDMD rispetto ai soggetti sani.



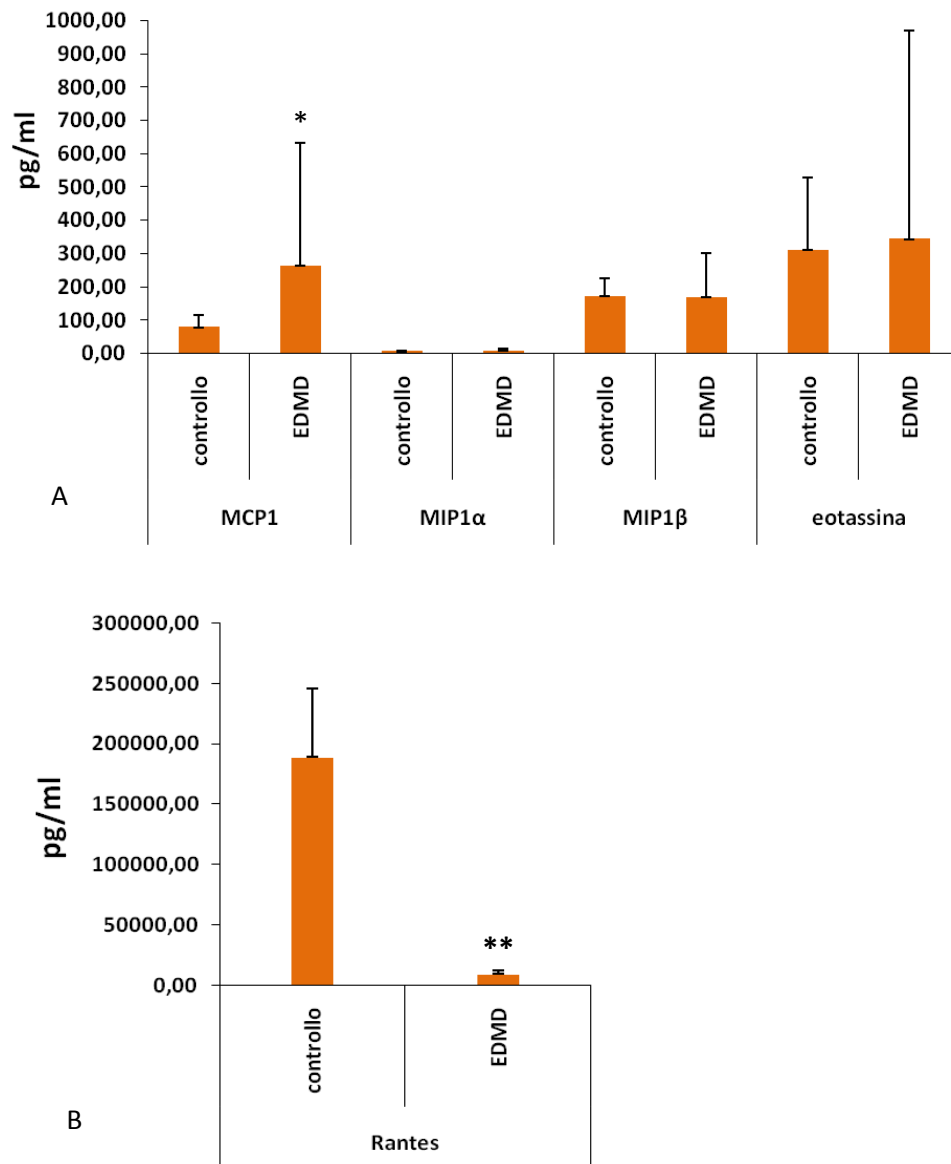
**Fig. 5 Livelli di citochine proinfiammatorie in sieri EDMD.** (a) L'analisi effettuata non mostra delle variazioni rilevanti di IL- $\beta$ 1, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-2 e IL-8 tra pazienti e soggetti sani. (b) L'IL-17 presenta valori notevolmente più alti nei pazienti rispetto a quelli riscontrati nei controlli. In particolare, sono stati distinti due gruppi di pazienti in base alla quantità di citochina misurata: l'aumento dell'IL17 non è influenzato da età e sesso dei pazienti (\* p<0,05; \*\*p<0,01).



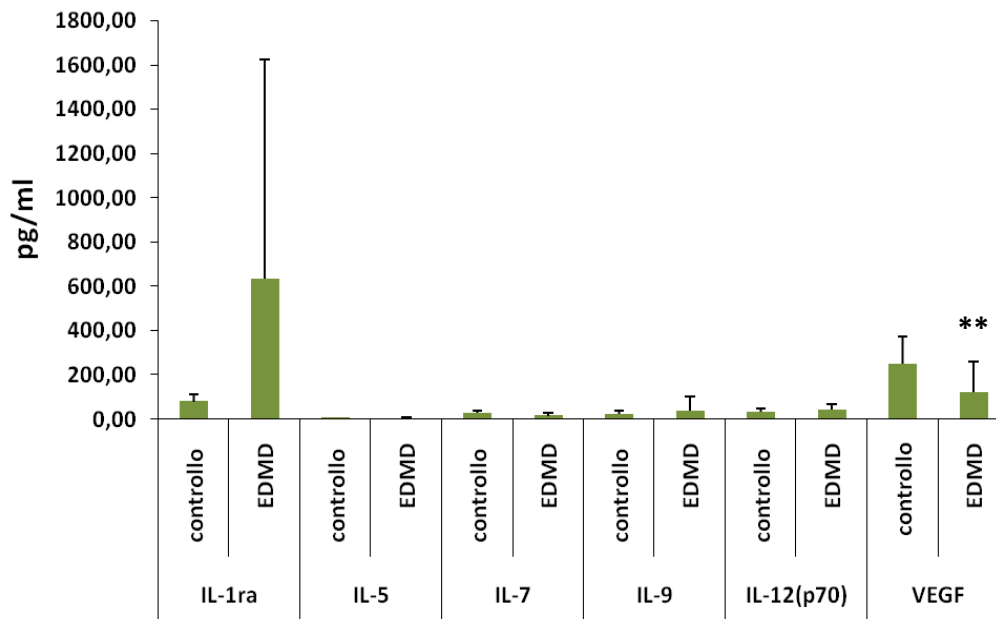
**Fig.6 Analisi dei livelli di TGFβ in sieri EDMD.** L'analisi dei livelli di TGFβ1 ha mostrato un aumento della concentrazione nel siero di pazienti EDMD rispetto ai controlli sani (a). Un aumento dei livelli di secrezione nei pazienti, rispetto ai controlli sani, si è registrato anche per il TGFβ2; il TGFβ3, invece, non mostra una significativa differenza tra pazienti e controlli (b). Il grafico dell'andamento di secrezione per singoli soggetti evidenzia come il 39% dei pazienti EDMD mostri un aumento di tre volte superiore a quello riscontrato nei sieri controllo (c). L'analisi dell'IL-4, IL-10, IL-13 non ha evidenziato delle variazioni significative tra campioni. L'INFγ è risultato significativamente aumentato nei pazienti EDMD rispetto ai soggetti sani (d). (\* p<0.05, \*\* p<0.01).







**Fig. 7 Livelli di chemochine in sieri EDMD.** (a) Dall'analisi delle chemochine MIP1 $\alpha$ , MIP1 $\beta$  e eotassina non si evidenziano delle variazioni significative tra pazienti e controlli. MCP1 presenta un aumento significativo nei sieri EDMD a fronte di valori di secrezione superiori ai controlli nel 32% dei pazienti. (b) I livelli di RANTES sono ridotti nei sieri EDMD. (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ).

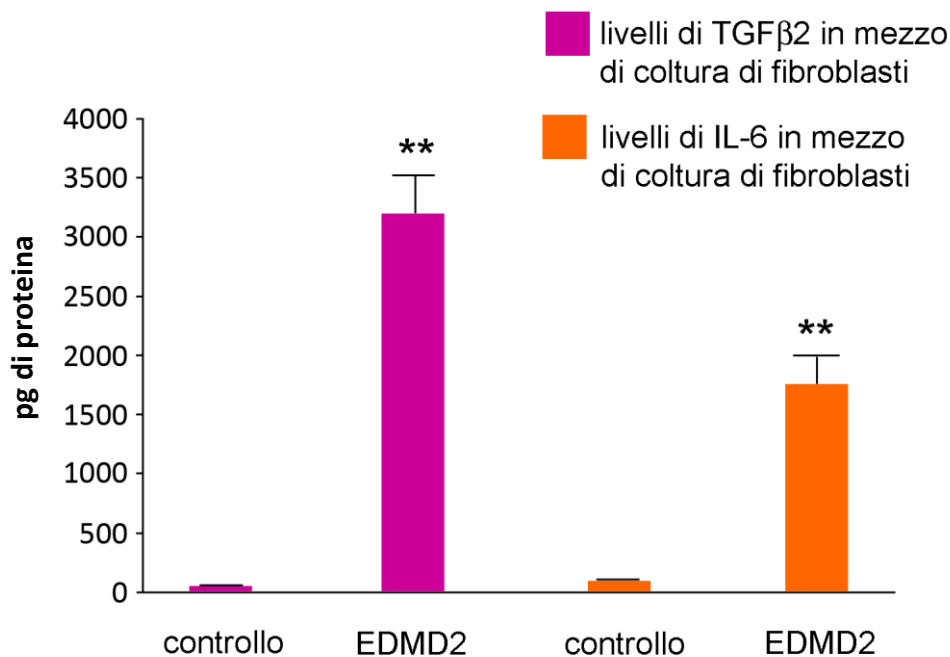


**Fig. 8 Livelli di citochine in siero EDMD.** Le interleuchine analizzate non mostrano variazione significative; l'IL-1ra seppur alterata in alcuni pazienti non presenta una variazione statisticamente significativa. Si evidenzia una riduzione del valore medio di VEGF nei pazienti EDMD rispetto ai controlli sani (\*\*  $p < 0,01$ ).

Altre citochine che risultano alterate nei pazienti EDMD sono state correlate a diverse forme di distrofie e laminopatie come descritto nei capitoli precedenti. Una delle citochine che maggiormente ha suscitato attenzione è stata il  $TGF\beta_2$ , una citochina che è stata associata ad effetti sul riassorbimento osseo nella distrofia di Duchenne e nella displasia mandibuloacrale (Rufo A., 2011, Avnet S., 2011). Lo studio di questa citochina nell'EDMD è proseguita con l'analisi di secrezione in colture di fibroblasti di pazienti EDMD2 attraverso saggio ELISA. I fibroblasti esaminati erano derivati da pazienti con mutazione *LMNA*. L'analisi del terreno di coltura prelevato da fibroblasti EDMD e controllo in coltura ha evidenziato un aumento dei valori del  $TGF\beta_2$  (Fig.10 )

Allo stesso modo è stata valutata l'espressione dell'IL-6 nel terreno di coltura di fibroblasti EDMD2. L'interleuchina 6 è anch'essa correlata a diverse forme di distrofie a causa della sua azione pro-infiammatoria nel muscolo, e alti livelli di mRNA sono stati evidenziati in pazienti EDMD (Moiseeva O., 2011). Nonostante i livelli di IL-6 nel siero di pazienti EDMD2 non abbiano mostrato delle variazioni rilevanti, l'espressione

dell'IL6 è risultata significativamente alterata nei fibroblasti EDMD2 rispetto ai controlli.



**Fig. 10 Livelli di IL-6 e TGFβ2 in mezzo di coltura di fibroblasti EDMD2.** Si evidenzia un aumento dei livelli di IL-6 e TGFβ2 in colture di fibroblasti EDMD2 rispetto a colture controllo (\*\*  $p < 0,01$ ).

### 3.3 Studio dell'effetto delle citochine nel differenziamento miogenico

Fenotipicamente, mioblasti EDMD in coltura si caratterizzano per una riduzione delle dimensioni dei miotubi nonché per un disorganizzazione nucleare che si presenta come dismorfismo dei nuclei nei miotubi e raggruppamento dei nuclei in una porzione del miotubo (Mattioli M., 2011; Meinke P., 2014). Questi difetti sono stati correlati alla ridotta interazione tra prelamin A farnesilata (espressa a livelli ridotti nei miotubi EDMD2) e la proteina del complesso LINC SUN1 (Mattioli et al., 2011). Abbiamo supposto che l'alterata secrezione di citochine potesse influenzare il fenotipo descritto, contribuendo ai meccanismi patogenetici.

È stato utilizzato un modello cellulare di mioblasti murini C2C12 trasfettati permanente con una mutazione knock-in per sostituzione H222P del gene

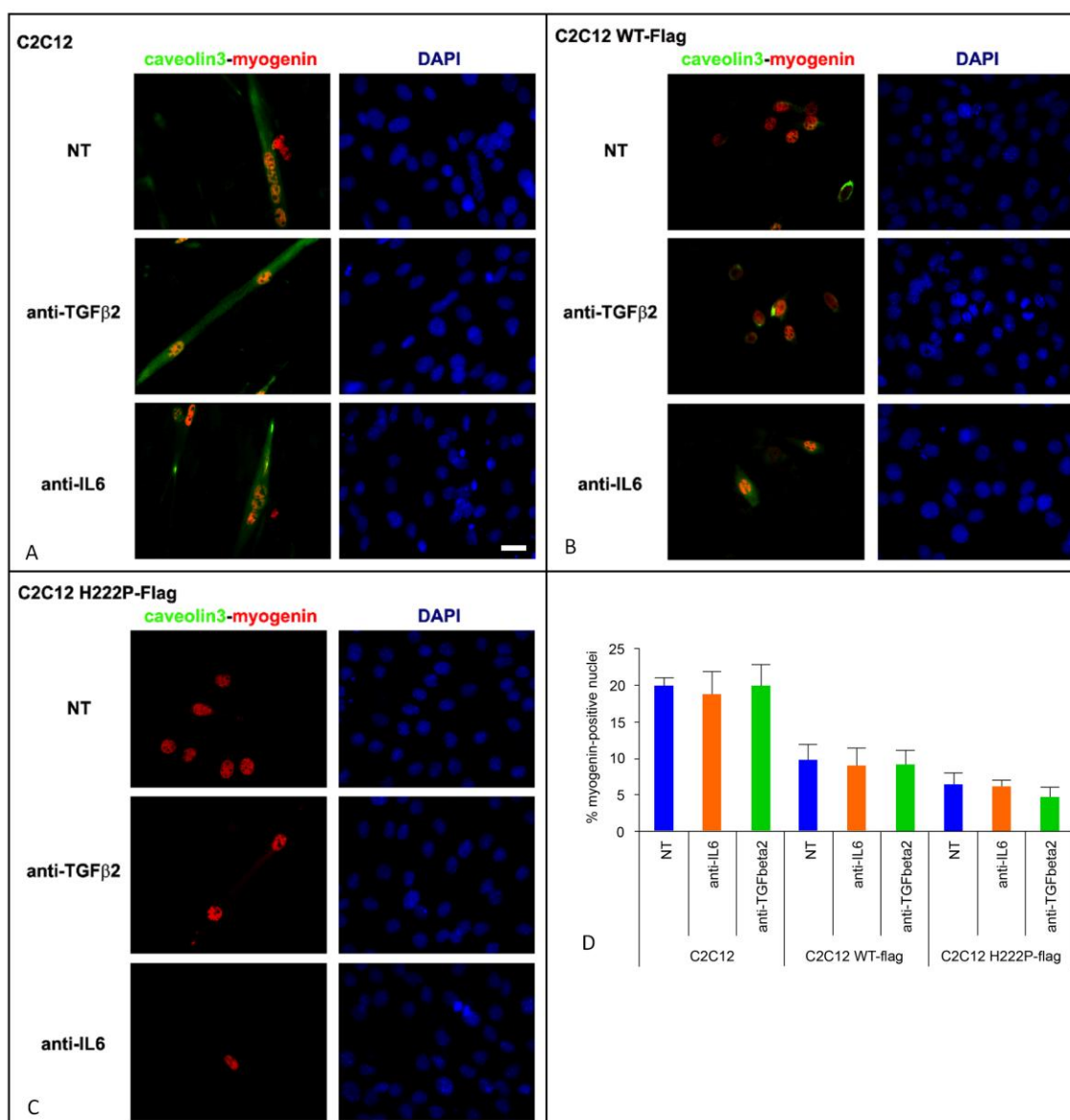
*Lmna* responsabile della forma autosomica dominante della distrofia di Emery-Dreifuss (EDMD2). Il modello cellulare è stato utilizzato tramite una collaborazione con il gruppo di ricerca coordinato dalla professoressa Gisèle Bonne dell'Istituto di miologia presso l'ospedale Salpêtrière di Parigi. Nell'istituto della Dott.ssa Bonne sono stati da me trattati i mioblasti, trasfettati con la mutazione *Lmna*<sup>H222P/H222P</sup>, con anticorpi neutralizzanti contro l'IL-6 e il TGFβ2. Al termine del trattamento è stato valutato il fenotipo cellulare dei mioblasti attraverso l'analisi in microscopia a fluorescenza di proteine coinvolte nel differenziamento miogenico. Una delle proteine analizzate per lo studio del differenziamento miogenico è stata la miogenina, un fattore di trascrizione coinvolto nello sviluppo del muscolo scheletrico, dalla miogenesi al riparo, oltre ad indurre miogenesi in una varietà di tipi cellulari (Hasty P., 1993). La miogenina si esprime nei nuclei dei mioblasti commissionati per il differenziamento e nei nuclei dei miotubi, mentre non è espressa nei mioblasti proliferanti o nelle cellule satelliti non attivate (Capanni C., 2008).

L'altra proteina analizzata è stata la caveolina 3. La caveolina 3 è una proteina muscolo-specifica espressa nel citoplasma e nelle caveole dei mioblasti commissionati al differenziamento e dei miotubi. Nel muscolo maturo è presente a livello del sistema del tubulo T, in un'area sarcolemmale importante per la trasmissione elettrica dell'impulso contrattile; insieme alla distrofina forma un complesso distrofina-glicoproteine che conferisce stabilità alla fibra muscolare (Gazzerro E., 2010).

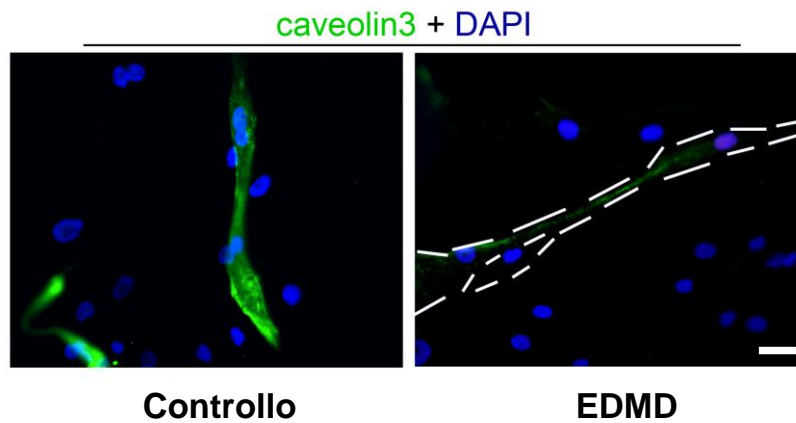
La figura 10 mostra il grado di differenziamento dei mioblasti C2C12 non trasfettati, trasfettati con lamina A WT o trasfettati con il costrutto recante la mutazione *Lmna*<sup>H222P/H222P</sup>. I mioblasti C2C12 che esprimevano lamina A WT hanno evidenziato grado di differenziamento ridotto di circa il 50% rispetto ai mioblasti murini non trasfettati come mostrato dal grafico di espressione di miogenina. Tuttavia i livelli di miogenina nei mioblasti che esprimevano la mutazione *Lmna*<sup>H222P/H222P</sup> erano significativamente ridotti rispetto ai mioblasti che esprimevano il gene *Lmna* WT (Fig. 10d). Questi dati indicavano un effetto inibitorio del differenziamento da parte della

lamina A quando espressa a livelli elevati e un ulteriore effetto inibitorio legato alla presenza della mutazione H222P.

Nelle cellule C2C12 portatrici della mutazione *Lmna*<sup>H222P/H222P</sup> è stata inoltre osservata una assenza dell'espressione di caveolina 3 nei mioblasti differenziati (positivi alla miogenina) rispetto alle cellule non trasfettate o trasfettate con il costrutto WT. La valutazione del fenotipo differenziativo è stata effettuata anche in mioblasti di pazienti EDMD. I mioblasti umani EDMD indotti a differenziare per 10 giorni e poi marcati, per analisi di microscopia ottica a fluorescenza, con anticorpo specifico per la caveolina 3, hanno mostrato una riduzione di espressione di caveolina 3 nei mitotubi e nelle cellule satellite rispetto a mitotubi umani controllo (Fig. 11). Per esaminare gli effetti legati alla secrezione delle citochine IL6 e TGFbeta 2, abbiamo trattato le colture di mioblasti C2C12 con anticorpi neutralizzanti diretti contro TGFbeta 2 o recettore dell'IL6. Il trattamento con anticorpi neutralizzanti non ha determinato un miglioramento del livello di differenziamento miogenico.



**Fig. 10** Trattamento con anticorpi neutralizzanti in mioblasti murini C2C12. Mioblasti C2C12 WT trattati con anticorpi neutralizzanti contro TGFβ2 e IL-6 sono stati marcati con anti-caveolina 3 per analisi di microscopia a fluorescenza; l'anticorpo primario è stato rilevato con anticorpo secondario coniugato FITC. La miogenina è stata rilevata con anticorpo primario specifico e rilevato con secondario TRIC coniugato: i miotubi presentano una normale morfologia con una corretta localizzazione nucleare (a). Mioblasti C2C12 trasfettati con costrutto WT del gene *Lmna* presentano una mancanza di fusione dei miotubi durante il differenziamento (b). L'analisi di C2C12 H222P-flag mostrano un'assenza di fusione nucleare dei miotubi e assenza di espressione di caveolina 3 (c) (barra: 10μm). percentuale di mioblasti in fase di differenziamento attivo: la presenza del costrutto WT e mutato riduce i livelli di differenziamento come evidenziato dalla percentuale di nuclei positivi alla miogenina. Il trattamento con anticorpi neutralizzanti non migliora il grado di differenziamento miogenico (d).



**Fig. 11 Espressione di caveolina 3 in miotubi umani EDMD.** Mioblasti umani provenienti da pazienti EDMD e soggetti controlli sono stati indotti a differenziare per 10 giorni. Al termine del differenziamento la marcatura con anticorpo specifico, per analisi di microscopia ottica a fluorescenza, della caveolina 3 ha evidenziato una ridotta espressione della proteina nei miotubi e in cellule satellite come evidenziato dall'immagine che mostra l'intero miotubo e la cellula satellite adiacente con un ridotta espressione della caveolina 3 in relazione al miotubo controllo nella fase attiva del differenziamento. (barra: 10 $\mu$ m)

In accordo con questo risultato, l'analisi in ELISA dei terreni di coltura ha escluso l'alterazione dei livelli di queste citochine nelle colture analizzate.

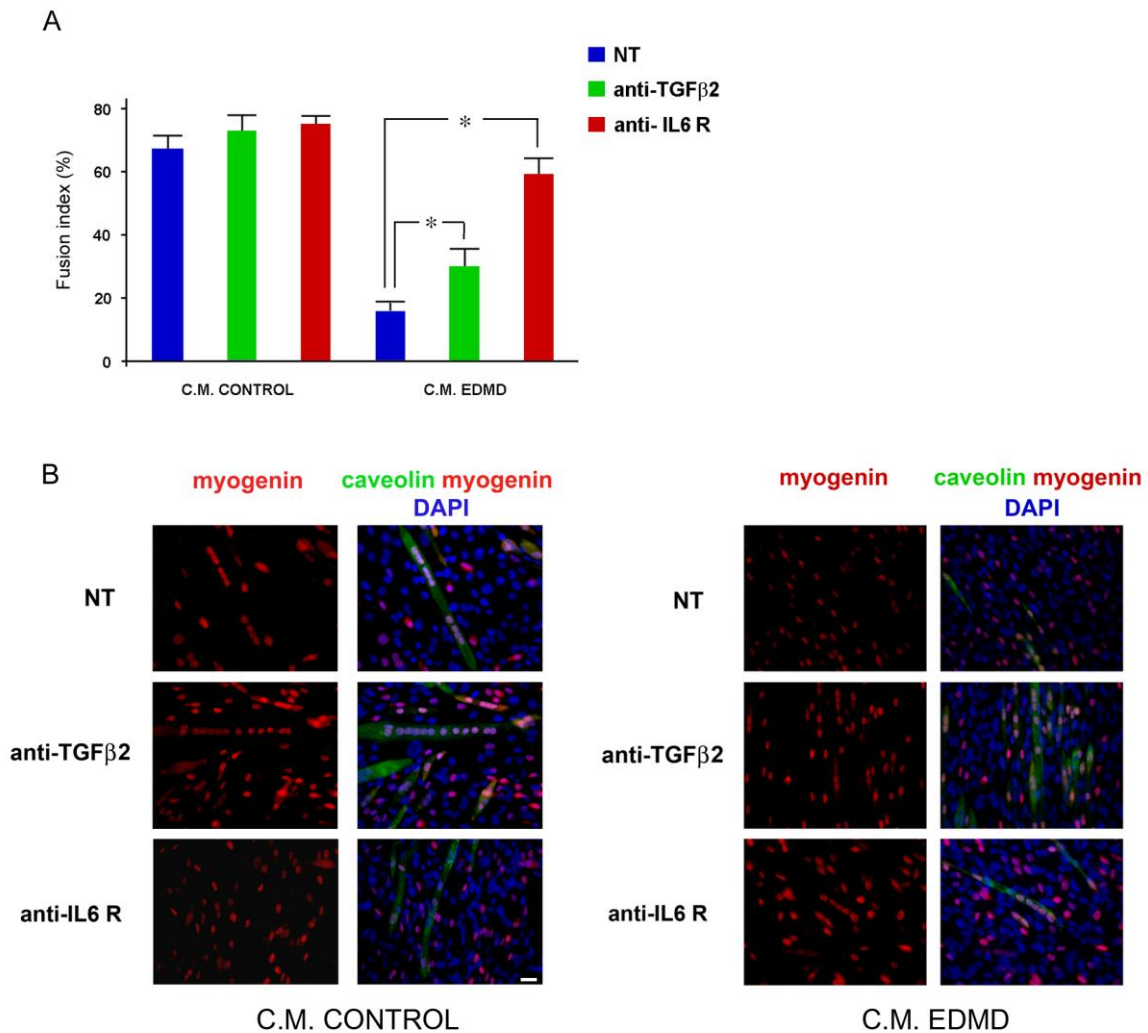
Abbiamo quindi indagato se le citochine prodotte dal tessuto fibrotico potessero influenzare il differenziamento dei mioblasti. L'alterata espressione di TGF $\beta$ 2 e IL-6 nei fibroblasti umani EDMD, come rilevato dal saggio ELISA, ci ha indotto ad analizzare questo possibile aspetto della patologia studiata. L'approccio sperimentale è stato basato sull'utilizzo di mioblasti C2C12 condizionati con terreni di coltura di fibroblasti provenienti da pazienti EDMD. Questo approccio ha permesso di valutare il profilo differenziantivo in condizioni patologiche ipotizzando che fattori secreti da fibroblasti o circolanti nel siero EDMD possano indurre alterazioni cellulari. Una coltura di mioblasti C2C12 è stata allestita e trattata con terreno di condizionamento di fibroblasti di soggetti controllo e di fibroblasti di pazienti EDMD per 72h, tempo utile per studiare un primo livello di differenziamento miogenico. Al termine del condizionamento è stato valutato il fenotipo cellulare dei mioblasti attraverso l'analisi di microscopia ottica in contrasto di fase e a fluorescenza. L'analisi al microscopio a fluorescenza dei mioblasti indotti al differenziamento, in terreno condizionato di fibroblasti controllo, ha mostrato una normale espressione di miogenina e di caveolina 3 nei miotubi differenziati (Fig.

12c); la percentuale di miotubi in coltura con più di tre nuclei è stata del 67% rispetto ai mioblasti positivi alla miogenina. I miotubi maturi presentano nuclei organizzati e allineati lungo tutta la cellula muscolare. La coltura di mioblasti condizionata con terreno di fibroblasti EDMD ha evidenziato una notevole riduzione del differenziamento con una percentuale di miotubi del 16% rispetto ai mioblasti singoli esprimenti la miogenina. I miotubi inoltre, presentavano dimensioni ridotte rispetto ai controlli. I livelli di miogenina e caveolina 3, risultavano ridotti in relazione al ridotto grado di differenziamento della coltura, ma i livelli di caveolina 3 nei miotubi apparivano comparabili ai controlli. Questi dati ci hanno indotto a supporre un possibile effetto sistemico causato da fattori circolanti nei fibroblasti EDMD che potessero alterare il differenziamento miogenico.

Abbiamo supposto la possibilità che citochine circolanti potessero influire sul ritardo nel differenziamento miogenico dei mioblasti in coltura. Abbiamo quindi utilizzato due anticorpi neutralizzanti specifici per due delle citochine maggiormente aumentate nei terreni di fibroblasti EDMD analizzati tramite saggio ELISA: il TGF $\beta$ 2 e l'IL6. Dopo trattamento per 72 ore con anticorpi neutralizzanti anti-TGF $\beta$ 2 e anti-recettore dell'IL-6 la valutazione attraverso microscopia a fluorescenza ha evidenziato sostanziali differenze nel grado di differenziamento miogenico. Il trattamento con anticorpi neutralizzanti effettuato in mioblasti C2C12 condizionati con terreni di fibroblasti WT ha indotto un lieve ma non significativo incremento del differenziamento miogenico. Il trattamento con anti-TGF $\beta$ 2 di mioblasti C2C12 condizionati con terreno di fibroblasti EDMD ha portato ad un miglioramento del tasso di differenziamento con un valore percentuale del 30% di miotubi differenziati dopo 72 ore di condizionamento; il trattamento con anti-IL-6 ha evidenziato un grado di differenziamento del 59,5%. Il fenotipo dei miotubi maturi presentava anche un miglioramento nelle dimensioni dei miotubi e nell'organizzazione dei nuclei: in particolare si è avuto un aumento delle dimensioni dei miotubi rispetto ai non trattati, i quali apparivano di dimensioni minori e con un minor grado di fusione nucleare; anche l'organizzazione nucleare risultava migliorata grazie ad un allineamento dei nuclei lungo il miotubo, a



differenza di fenomeni di clustrerizzazione nucleare nei miotubi non trattati con anticorpi. Lo studio del differenziamento miogenico in terreno condizionato ha evidenziato quindi un effetto negativo del tessuto fibrotico EDMD2 legato alla secrezione di TGFbeta 2 e IL6 da parte dei fibroblasti. A tale effetto va probabilmente ad aggiungersi l'effetto sistemico determinato dall'alterato profilo delle citochine nel siero descritto in questo studio.



**Fig. 12 Differenziamento di mioblasti murini C2C12 in presenza di terreno condizionato da fibroblasti EDMD2.** (a) L'analisi dei terreni di coltura di fibroblasti tramite saggio ELISA mostra un aumento significativo dei valori di TGFβ2 e IL-6 nei campioni EDMD rispetto ai controlli (\*  $p < 0,05$ ). (B) Il mezzo condizionato da fibroblasti EDMD2 riduce drasticamente il grado di differenziamento miogenico in colture di cellule C2C12. Il trattamento di mioblasti C2C12 con anticorpi neutralizzanti per TGFβ2 e IL-6 migliora il profilo differenziativo nei mioblasti C2C12 in terreno condizionato di fibroblasti EDMD2. I dati rappresentati nel grafico sono medie di tre valori ottenuti in esperimenti diversi  $\pm$  deviazione standard. (c) Analisi in microscopia a fluorescenza dei marcatori di differenziamento miogenico miogenina (rosso) e caveolina 3 (verde) (barra: 10μm).

#### **4. Discussione e conclusioni**

Lo studio è stato incentrato sull'analisi di citochine nella Distrofia muscolare di Emery-Dreifuss al fine di individuare possibili marker patogenetici e bersagli terapeutici.

L'analisi effettuata attraverso test multiparametrico ha evidenziato una differente produzione di alcune delle citochine analizzate nei sieri di pazienti EDMD rispetto ad individui controllo. L'analisi ha mostrato un aumento dei valori di TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2 e INF $\gamma$  nel siero dei pazienti EDMD. Altra citochina che presentava valori aumentati nei pazienti EDMD è stata l'IL-17. L'IL-17 è una citochina pro-infiammatoria che agisce come mediatore nelle reazioni di tipo ritardato aumentando la produzione di chemochine in vari tessuti per reclutare monociti e neutrofili nei siti di infiammazione (Kuby Immunology, 2017); l'aumento dei valori di IL-17 è stato anche associato a stati infiammatori in pazienti affetti da distrofia muscolare di Duchenne (De Pasquale, 2012). Sebbene l'aumento di questa citochina fosse presente in tutti i pazienti rispetto ai soggetti controllo, si sono riscontrati valori differenti di secrezione riconducibili a due gruppi di pazienti. I due gruppi tuttavia non si caratterizzavano per sesso o età dei pazienti. Inoltre l'alterazione di IL17 si osservava sia in pazienti affetti da EDMD1 che EDMD2.

Altri fattori hanno mostrato livelli alterati in pazienti EDMD: la chemochina RANTES ha registrato una notevole riduzione dei valori in tutti i pazienti EDMD. Un aumento dei livelli di MCP-1 era presente nel 36% di pazienti EDMD: ad una prima analisi anche questa chemochina ha mostrato un aumento eterogeneo nei diversi pazienti e tale alterazione non era associata a singole forme di EDMD. Questa chemochina risulta avere un ruolo patofisiologico importante nella progressione di cardiomiopatie in pazienti con insufficienza cardiaca (Hohensinner P.J., 2010). Sarà importante per indagini future analizzare possibili correlazioni tra effettivo aumento di MCP-1 e coinvolgimento cardiaco in pazienti EDMD, con la possibilità di identificare questa citochina come marker patogenetico nella patologia.

Il coinvolgimento di citochine come TGF $\beta$ 2, IL-17 e INF $\gamma$  è stato correlato ad eventi infiammatori in distrofie muscolari. Nella distrofia muscolare di

Emery-Dreifuss non si osserva però un'inflammatione cronica muscolare. E' quindi plausibile che il ruolo svolto da queste citochine nella patogenesi dell'EDMD sia legato al loro effetto diretto sul fenotipo muscolare. Lo studio effettuato utilizzando terreni di condizionamento provenienti da fibroblasti EDMD ha suggerito come la produzione di TGFbeta 2 da parte del tessuto fibrotico possa influenzare il differenziamento di mioblasti controllo riducendone l'attivazione. La risposta positiva ad anticorpi neutralizzanti, oltre a supportare il ruolo specifico di TGFbeta 2 e IL6 nel meccanismo patogenetico, ha confermato come l'azione diretta contro citochine alterate possa produrre un miglioramento del fenotipo delle cellule muscolari. Di ulteriore importanza sarà l'individuazione di un pathway di segnalazione intracellulare di TGFbeta 2 in cellule muscolari EDMD in modo chiarire il meccanismo inibitorio esercitato dal TGFbeta2 sul differenziamento muscolare e possibilmente individuare altri possibili bersagli terapeutici. Un ruolo del TGFbeta 2 è stato evidenziato in un'altra laminopatia, la displasia mandibuloacrale, ed è stato dimostrato che in dipendenza da questa citochina si ha un alterata attivazione dell'osteoclastogenesi (Avnet S., 2011). Non sono riportati dati sugli effetti del TGFβ2 nel differenziamento muscolare. Tuttavia, considerato che prerequisito per l'induzione del differenziamento dei mioblasti è la loro uscita dal ciclo cellulare che precede lo stato di mioblasto commissionato al differenziamento (Lattanzi G., 2001), è plausibile che il TGFβ2 favorisca la proliferazione cellulare rallentando in tal modo l'inizio della fase di differenziamento. In accordo con questa ipotesi, uno studio molto recente ha dimostrato che l'aumento di TGFβ2 favorisce il processo fibrotico in cellule staminali muscolari nel modello murino della distrofia muscolare di Duchenne (Biressi S., 2014). L'aumento di TGFβ2 è stato evidenziato sia a livello locale che sistemico, mentre l'incremento di IL6, molto rilevante per l'inibizione esercitata sul differenziamento muscolare, è stato osservato solo nel mezzo di coltura dei fibroblasti EDMD2. Questo indica che fattori di diversa provenienza contribuiscono all'aggravamento del fenotipo EDMD. L'IL-6 è una citochina implicata nei processi di senescenza cellulare. Nei nostri esperimenti non abbiamo osservato induzione di senescenza da parte

dei mezzi condizionati da fibroblasti EDMD, probabilmente grazie a meccanismi di compensazione esercitati da altre citochine (IL-17, TGF $\beta$ 2) o per l'attivazione di meccanismi di segnale compensatori. Un effetto riportato della IL-6 nelle cellule miogeniche è invece l'induzione della proliferazione, analogamente a quanto ipotizzato sopra per il TGF $\beta$ 2 (Toth K.G., 2011). Possiamo quindi suggerire che TGF $\beta$ 2 e IL-6 favoriscano la proliferazione di mioblasti EDMD, riducendo in tal modo il grado di differenziamento miogenico. Nello studio effettuato, fattori intrinseci alla cellula muscolare appaiono comunque giocare un ruolo rilevante nella patogenesi. La rallentata o ridotta produzione di caveolina 3, un componente essenziale delle caveole e del sarcolemma della fibra matura, può contribuire alla alterata segnalazione dall'ambiente alla fibra muscolare stessa. E' interessante notare che mutazioni della caveolina 3 sono causa di una forma di distrofia dei cingoli analoga all'EDMD (Galbiati F., 2000). Ulteriori studi sono richiesti per la valutazione di possibili effetti sinergici degli anticorpi neutralizzanti e per la validazione degli effetti osservati in modelli animali.

## 5. Bibliografia

ALZONA M., JÄCK H.M., FISHER R.I., ELLIS T.M. CD30 defines a subset of activated human T cells that produce IFN-gamma and IL-5 and exhibit enhanced B cell helper activity. *J. Immunol.* 1994 Oct 1;153(7):2861-7.

AGGARWAL B.B., KOHR W.J., HASS P.E., MOFFAT B., SPENCER S.A., HENZEL W.J., BRINGMAN T.S., NEDWIN G.E., GOEDEL D.V., HARKINS R.N. Human tumor necrosis factor. Production, purification, and characterization. *J. Biol. Chem.* 1985 Feb 25;260(4):2345-54.

AKHURST R.J., HATA A. Targeting the TGF $\beta$  signalling pathway in disease. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2012 Oct;11(10):790-811.

AVNET S., PALLOTTA R., PERUT F., BALDINI N., PITTIS M.G., SAPONARI A., LUCARELLI E., DOZZA B., GREGGI T., MARALDI N.M., CAPANNI C., MATTIOLI E., COLUMBARO M., LATTANZI G. Osteoblasts from a mandibuloacral dysplasia patient induce human blood precursors to differentiate into active osteoclasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 2011 Jul;1812(7):711-8.

BIONE S., MAESTRINI E., RIVELLA S., MANCINI M., REGIS S., ROMEO G., TONIOLO D. Identification of a novel X-linked gene responsible for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1994 Dec;8(4):323-7.

BIONE S., TAMANINI F., MAESTRINI E., TRIBIOLI C., POUSTKA A., TORRI G., RIVELLA S., TONIOLO D. Transcriptional organization of a 450-kb region of the human X chromosome in Xq28. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 1993 Dec 1;90(23):10977-81.

BIRESSI S., MIYABARA E.H., GOPINATH S.D., M. CARLIG P.M., RANDO T.A. A Wnt-TGF $\beta$ 2 axis induces a fibrogenic program in muscle stem cells from dystrophic mice. *Sci. Transl. Med.* 2014 Dec 17;6(267):267ra176.

BONNE G., DI BARLETTA M.R., VARNOUS S., BÉCANE H.M., HAMMOUDA E.H., MERLINI L., MUNTONI F., GREENBERG C.R., GARY F., URTIZBEREA J.A., DUBOC D., FARDEAU M., TONIOLO D., SCHWARTZ K. Mutations in the gene encoding lamin A/C cause autosomal dominant Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Nat. Genet.* 1999 Mar;21(3):285-8.

BROWN C.A., LANNING R.W., MCKINNEY K.Q., SALVINO A.R., CHERNISKE E., CROWE C.A., DARRAS B.T., GOMINAK S., GREENBERG C.R., GROSMANN C., HEYDEMANN P., MENDELL J.R., POBER B.R., SASAKI T., SHAPIRO F., SIMPSON D.A., SUCHOWERSKY O., SPENCE J.E. Novel and recurrent mutations in lamin A/C in patients with Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Med. Genet.* 2001 Sep 1;102(4):359-67.

BURKS T.N., COHN R.D. Role of TGF- $\beta$  signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet. Muscle.* 2011 May 4;1(1):19.

CHAHBOUNI M., ESCAMES G., VENEGAS C., SEVILLA B., GARCÍA J.A., LÓPEZ L.C., MUÑOZ-HOYOS A., MOLINA-CARBALLO A., ACUÑA-CASTROVIEJO D. Melatonin treatment normalizes plasma pro-inflammatory cytokines and nitrosative/oxidative stress in patients suffering from Duchenne muscular dystrophy. *J. Pineal. Res.* 2010 Apr;48(3):282-9.

CHOI J.C., WU W., MUCHIR A., IWATA S., HOMMA S., WORMAN H.J. Dual specificity phosphatase 4 mediates cardiomyopathy caused by lamin A/C (LMNA) gene mutation. *J. Biol. Chem.* 2012 Nov 23;287(48):40513-24.

CLARKE C.J., HALES A., HUNT A., FOXWELL B.M. IL-10-mediated suppression of TNF- $\alpha$  production is independent of its ability to inhibit NF kappa B activity. *Eur. J. Immunol.* 1998 May;28(5):1719-26.

DE JAGER W., BOURCIER K., RIJKERS G.T., PRAKKEN B.J., SEYFERT-MARGOLIS V. Prerequisites for cytokine measurements in clinical trials with multiplex immunoassays. *BMC Immunol.* 2009 Sep 28;10:52.

DE PASQUALE L., D'AMICO A., VERARDO M., PETRINI S., BERTINI E., DE BENEDETTI F. Increased muscle expression of interleukin-17 in Duchenne muscular dystrophy. *Neurology.* 2012 Apr 24;78(17):1309-14.

DYER J.A., LANE B.E., HUTCHISON C.J. Investigations of the pathway of incorporation and function of lamin A in the nuclear lamina. *Microsc Res Tech.* 1999 Apr 1;45(1):1-12.

EMERY A.E. Emery-Dreifuss muscular dystrophy - a 40 year retrospective. *Neuromuscul. Disord.* 2000 Jun;10(4-5):228-32.

EMERY A.E., DREIFUSS F.E. Unusual type of benign x-linked muscular dystrophy. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 1966 Aug;29(4):338-42.

FATKIN D., MACRAE C., SASAKI T., WOLFF M.R., PORCU M., FRENNEAUX M., ATHERTON J., VIDAILLET H.J. JR , SPUDICH S., DE GIROLAMI U., SEIDMAN J.G., SEIDMAN C.E. 1999. Missense mutations in the rod domain of the lamin A/C gene as causes of dilated cardiomyopathy and conduction-system disease. *N. Engl. J. Med.* 41:1715±1724.

FIDZIAŃSKA A., HAUSMANOWA-PETRUSEWICZ I. Architectural abnormalities in muscle nuclei. Ultrastructural differences between X-linked and autosomal dominant forms of EDMD. *J. Neurol. Sci.* 2003 Jun 15;210(1-2):47-51.

FILESI I., GULLOTTA F., LATTANZI G., D'APICE M.R., CAPANNI C., NARDONE A.M., COLUMBARO M., SCARANO G., MATTIOLI E., SABATELLI P., MARALDI N.M., BIOCCA S., NOVELLI G. Alterations of nuclear envelope and chromatin organization in mandibuloacral

dysplasia, a rare form of laminopathy. *Physiol. Genomics* 2005 Oct 17;23(2):150-8. Epub 2005 Jul 26.

FOXWELL B., BROWNE K., BONDESON J., CLARKE C., DE MARTIN R., BRENNAN F., FELDMANN M. Efficient adenoviral infection with IkappaB alpha reveals that macrophage tumor necrosis factor alpha production in rheumatoid arthritis is NF-kappaB dependent. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*. 1998 Jul 7;95(14):8211-5.

GALBIATI F., VOLONTE D., MINETTI C., BREGMAN D.B., LISANTI M.P. Limb-girdle muscular dystrophy (LGMD-1C) mutants of caveolin-3 undergo ubiquitination and proteasomal degradation. Treatment with proteasomal inhibitors blocks the dominant negative effect of LGMD-1C mutanta and rescues wild-type caveolin-3. *J. Biol. Chem.* 2000 Dec 1;275(48):37702-11.

GAZZERRO E., SOTGIA F., BRUNO C., LISANTI M.P., MINETTI C. Caveolinopathies: from the biology of caveolin-3 to human diseases. *Eur. J. Hum. Genet.* 2010 Feb;18(2):137-45.

GUENEAU L., BERTRAND A.T., JAIS J.P., SALIH M.A., STOJKOVIC T., WEHNERT M., HOELTZENBEIN M., SPULER S., SAITOH S., VERSCHUEREN A., TRANCHANT C., BEUVIN M., LACENE E., ROMERO N.B., HEATH S., ZELENKA D., VOIT T., EYMARD B., BEN YAOU R., BONNE G. Mutations of the FHL1 gene cause Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 2009 Sep;85(3):338-53.

HASTY P., BRADLEY A., MORRIS J.H., EDMONDSON D.G., VENUTI J.M., OLSON E.N., KLEIN W.H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. *Nature*. 1993 Aug 5;364(6437):501-6.

HIRANO T. The biology of interleukin-6. *Chem. Immunol.* 1992;51:153-80.

HIRANO T. Interleukin 6 and its receptor: ten years later. *Int. Rev. Immunol.* 1998;16(3-4):249-84.



HNIA K., GAYRAUD J., HUGON G., RAMONATXO M., DE LA PORTE S., MATECKI S., MORNET D. L-arginine decreases inflammation and modulates the nuclear factor-kappaB/matrix metalloproteinase cascade in mdx muscle fibers. *Am. J. Pathol.* 2008 Jun;172(6):1509-19.

HO C.Y., JAALOUK D.E., VARTIAINEN M.K., LAMMERDING J. Lamin A/C and emerin regulate MKL1-SRF activity by modulating actin dynamics. *Nature.* 2013 May 23;497(7450):507-11.

HORI Y.S., KUNO A., HOSODA R., TANNO M., MIURA T., SHIMAMOTO K., HORIO Y. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pharmacol Exp Ther.* 2011 Sep;338(3):784-94.

KOCH A.J., HOLASKA J.M. Loss of emerin alters myogenic signaling and miRNA expression in mouse myogenic progenitors. *PLoS One.* 2012;7(5):e37262.

LIANG W.C., MITSUHASHI H., KEDUKA E., NONAKA I., NOGUCHI S., NISHINO I., HAYASHI Y.K. TMEM43 mutations in Emery-Dreifuss muscular dystrophy-related myopathy. *Ann. Neurol.* 2011 Jun;69(6):1005-13.

LOMBARDI M.L., LAMMERDING J. Keeping the LINC: the importance of nucleocytoskeletal coupling in intracellular force transmission and cellular function. *Biochem. Soc. Trans.* 2011 Dec;39(6):1729-34.

MANILAL S., SEWRY C.A., PEREBOEV A., MAN N., GOBBI P., HAWKES S., LOVE D.R., MORRIS G.E. Distribution of emerin and lamins in the heart and implications for Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Hum. Mol. Genet.* 1999 Feb;8(2):353-9.

MARQUARDT H., LIOUBIN M.N., IKEDA T. Complete amino acid sequence of human transforming growth factor type beta 2. *J. Biol. Chem.* 1987 Sep 5;262(25):12127-31.

MARGALIT A., BRACHNER A., GOTZMANN J., FOISNER R., GRUENBAUM Y. Barrier-to-autointegration factor--a BAFfling little protein. *Trends Cell. Biol.* 2007 Apr;17(4):202-8. Epub 2007 Feb 21.

MASSAGUÉ J. TGF-beta signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.* 1998;67:753-91.

MATTIOLI E., COLUMBARO M., CAPANNI C., MARALDI N.M., CENNI V., SCOTLANDI K., MARINO M.T., MERLINI L., SQUARZONI S., LATTANZI G. Prelamin A-mediated recruitment of SUN1 to the nuclear envelope directs nuclear positioning in human muscle. *Cell Death Differ.* 2011 Aug; 18(8):1305-15.

MEINKE P., MATTIOLI E., HAQUE F., ANTOKU S., COLUMBARO M., STRAATMAN K.R., WORMAN H.J., GUNDERSEN G.G., LATTANZI G., WEHNERT M., SHACKLETON S. Muscular dystrophy-associated SUN1 and SUN2 variants disrupt nuclear-cytoskeletal connections and myonuclear organization. *PLoS Genet.* 2014 Sep 11; 10(9):e1004605.

MESSINA S., VITA G.L., AGUENNOUZ M., SFRAMELI M., ROMEO S., RODOLICO C., VITA G. Activation of NF-kappaB pathway in Duchenne muscular dystrophy: relation to age. *Acta Myol.* 2011 Jun;30(1):16-23.

MOISEEVA O., BOURDEAU V., VERNIER M., DABAUVALLE M.C., FERBEYRE G. Retinoblastoma-independent regulation of cell proliferation and senescence by the p53-p21 axis in lamin A/C-depleted cells. *Aging Cell.* 2011 Oct;10(5):789-97.

MORAGA I., SPANGLER J., MENDOZA J.L., GARCIA K.C. Multifarious determinants of cytokine receptor signaling specificity. *Adv. Immunol.* 2014; 121:1-39.

MUCHIR A., REILLY S.A., WU W., IWATA S., HOMMA S., BONNE G., WORMAN H.J. Treatment with selumetinib preserves cardiac function

and improves survival in cardiomyopathy caused by mutation in the lamin A/C gene. *Cardiovasc. Res.* 2012 Feb 1;93(2):311-9.

MUCHIR A., BONNE G., VAN DER KOOI A.J., VAN MEEGEN M., BAAS F., BOLHUIS P.A., DE VISSER M., SCHWARTZ K. Identification of mutations in the gene encoding lamins A/C in autosomal dominant limb girdle muscular dystrophy with atrioventricular conduction disturbances (LGMD1B). *Hum. Mol. Genet.* 2000 May 22; 9(9):1453-9.

NICOLA N.A. Cytokine pleiotropy and redundancy: a view from the receptor. 1994 *Stem Cells.*; 12 Suppl 1:3-12.

OSORIO F.G., BÁRCENA C., SORIA-VALLES C., RAMSAY A.J., DE CARLOS F., COBO J., FUEYO A., FREIJE J.M., LÓPEZ-OTÍN C. Nuclear lamina defects cause ATM-dependent NF- $\kappa$ B activation and link accelerated aging to a systemic inflammatory response. *Genes Dev.* 2012 Oct 15; 26(20):2311-24.

ONOFRE-OLIVEIRA P.C., SANTOS A.L., MARTINS P.M., AYUB-GUERRIERI D., VAINZOF M. Differential expression of genes involved in the degeneration and regeneration pathways in mouse models for muscular dystrophies. *Neuromolecular Med.* 2012 Mar; 14(1):74-83.

RAFFAELE DI BARLETTA M., RICCI E., GALLUZZI G., TONALI P., MORA M., MORANDI L., ROMORINI A., VOIT T., ORSTAVIK K.H., MERLINI L., TREVISAN C., BIANCALANA V., HOUSMANOWA-PETRUSEWICZ I., BIONE S., RICOTTI R., SCHWARTZ K., BONNE G., TONIOLO D. Different mutations in the LMNA gene cause autosomal dominant and autosomal recessive Emery-Dreifuss muscular dystrophy. *Am. J. Hum. Genet.* 2000 Apr;66(4):1407-12.

RUFO A., DEL FATTORE A., CAPULLI M., CARVELLO F., DE PASQUALE L., FERRARI S., PIERROZ D., MORANDI L., DE SIMONE M., RUCCI N., BERTINI E., BIANCHI M.L., DE BENEDETTI F., TETI A. Mechanisms inducing low bone density in Duchenne muscular dystrophy in mice and humans. *J. Bone Miner. Res.* 2011 Aug; 26(8):1891-903.

SEGURA-TOTTEN M., WILSON K.L. BAF: roles in chromatin, nuclear structure and retrovirus integration. *Trends Cell Biol.* 2004 May;14(5):261-6.

SINENSKY M., FANTLE K., TRUJILLO M., MCLAIN T., KUPFER A., DALTON M. The processing pathway of prelamin A. *J. Cell Sci.* 1994 Jan;107 ( Pt 1):61-7.

SINHA S., NEVETT C., SHUTTLEWORTH C.A., KIELTY C.M. Cellular and extracellular biology of the latent transforming growth factor-beta binding proteins. *Matrix Biol.* 1998 Dec; 17(8-9):529-45.

TEN DIJKE P., HILL C.S. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem. Sci.* 2004 May; 29(5):265-73.

TOTH K.G., MCKAY B.R., DE LISIO M., LITTLE J.P., TARNOPOLSKY M.A., PARISE G. IL-6 induced STAT3 signalling is associated with the proliferation of human muscle satellite cells following acute muscle damage. *PLoS One.* 2011 Mar 9;6(3):e17392.

URA S., HAYASHI Y.K., GOTO K., ASTEJADA M.N., MURAKAMI T., NAGATO M., OHTA S., DAIMON Y., TAKEKAWA H., HIRATA K., NONAKA I., NOGUCHI S., NISHINO I. Limb-girdle muscular dystrophy due to emerin gene mutations. *Arch. Neurol.* 2007 Jul; 64(7):1038-41.

VILCEK J., PALOMBELLA V.J. TNF as a growth factor. *Immunol. Ser.* 1992;56:269-87.

VILLALTA S.A., DENG B., RINALDI C., WEHLING-HENRICKS M., TIDBALL J.G. IFN- $\gamma$  promotes muscle damage in the mdx mouse model of Duchenne muscular dystrophy by suppressing M2 macrophage activation and inhibiting muscle cell proliferation. *J. Immunol.* 2011 Nov 15;187(10):5419-28.

VOIT T., KROGMANN O., LENARD H.G., NEUEN-JACOB E., WECHSLER W., GOEBEL H.H., RAHLF G., LINDINGER A.,

NIENABER C. Emery-Dreifuss muscular dystrophy: disease spectrum and differential diagnosis. *Neuropediatrics*. 1988 May; 19(2):62-71.

ZHANG Q., BETHMANN C., WORTH N.F., DAVIES J.D., WASNER C., FEUER A., RAGNAUTH C.D., YI Q., MELLAD J.A., WARREN D.T., WHEELER M.A., ELLIS J.A., SKEPPER J.N., VORGERD M., SCHLOTTER-WEIGEL B., WEISSBERG P.L., ROBERTS R.G., WEHNERT M., SHANAHAN C.M.. Nesprin-1 and -2 are involved in the pathogenesis of Emery Dreifuss muscular dystrophy and are critical for nuclear envelope integrity. *Hum. Mol. Genet*. 2007 Dec 1;16(23):2816-33.

YAMAZAKI M., MINOTA S., SAKURAI H., MIYAZONO K., AMADA A., KANAZAWA I., KAWAI M. Expression of transforming growth factor-beta 1 and its relation to endomysial fibrosis in progressive muscular dystrophy. *Am. J. Pathol*. 1994 Feb;144(2):221-6.